

Nul n'est prophète en sa patrie...

Université de Sherbrooke

**Caractérisation des mécanismes moléculaires responsables du maintien
de l'homéostasie cryptale dans l'intestin grêle humain**

Par

Yannick D. Benoit

Département d'anatomie et biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention
du grade de philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire

Août 2010

Jury :

Professeur Jean-François Beaulieu, Biologie cellulaire

Professeur Pierre H. Vachon, Biologie cellulaire

Professeur Guylain Boissonneault, Biochimie

Professeur Gaétan Thibault, IRCM, Université de Montréal

Publications

Une partie des résultats présentés dans cette thèse de doctorat ont fait l'objet de publications dans des revues scientifiques avec comité de révision par les pairs :

Benoit Y.D., Pare F., Francoeur C., Jean D., Tremblay E., Boudreau F., Escaffit F. and Beaulieu JF. *Co-operation between HNF-1 α , Cdx2 and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal, human intestinal epithelial progenitor cell line.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. April 2010, 298(4):G504-17.

Benoit Y.D., Lussier C., Ducharme P.A., Sivret S., Schnapp L.M., Basora N. and Beaulieu JF. *Integrin $\alpha 8 \beta 1$ regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK dependent mechanism.* Biol Cell. December 2009, 101(12):695-708.

Benoit Y.D., Larrivée JF., Groulx JF, Stankova J., Vachon P.H. and Beaulieu JF. *Integrin $\alpha 8 \beta 1$ confers anoikis susceptibility in human intestinal epithelial crypt cells.* Biochem Biophys Res Commun. August 3 (Epub ahead of print), 2010.

Benoit Y.D., Khalfaoui T., Lepage M.B., Roy P., Tremblay E. and Beaulieu JF. *Epigenetic chromatin modifications are involved in the regulation of the intestinal differentiation program.* Soumission: Août 2010.

Table des matières

Index des figures.....	vii
Index des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Résumé.....	xii
I – Introduction.....	1
1.1 La muqueuse intestinale.....	1
1.2 L'épithélium de l'intestin grêle.....	2
1.3 L'axe crypte-villosité.....	3
1.4 La différenciation entérocytaire.....	6
1.5 Les cellules souches.....	12
1.6 Les cellules souches intestinales.....	15
1.7 Les protéines du groupe polycomb.....	21
1.8 La matrice extracellulaire et les intégrines.....	26
1.9 L'intégrine $\alpha 8\beta 1$	31
1.10 Les cellules HIEC.....	33
1.11 Projet de recherche et hypothèses.....	35
II – Matériel et méthodes.....	38
2.1 Culture cellulaire.....	38
2.2 Traitement des spécimens tissulaires humains.....	39
2.3 Conception des lignées HIEC inductibles et établissement des modèles de surexpression constitutives.....	40
2.4 Établissement des lignées shRNA.....	41

2.5 Extraction protéique.....	42
2.6 Extraction d'ARN et génération des échantillons d'ADNc.....	43
2.7 Réaction de polymérase en chaîne (PCR) et PCR quantitatif.....	44
2.8 Immunobuvardage.....	47
2.9 Immunofluorescence.....	49
2.10 Génération des peptides GST-TNfn3.....	52
2.11 Essais d'adhésion cellulaire.....	52
2.12 Essais de migration cellulaire par induction de blessures.....	54
2.13 Culture de cellules en suspension.....	55
2.14 Essais de pull-down rhotekine.....	56
2.15 Courbes de prolifération.....	56
2.16 Essais d'incorporation de BrdU.....	57
2.17 Cytométrie par balayage laser en condition adhérentes.....	58
2.18 Cytométrie de flux.....	59
2.19 Microscopie électronique.....	59
2.20 Analyses par micropuces à ADN.....	60
2.21 Analyses statistiques.....	61
III – Résultats.....	62
3.1 Détermination du patron d'expression des facteurs Cdx-2 et HNF1 α au niveau de la muqueuse intestinale humaine.....	62
3.2 Établissement et caractérisation de lignées HIEC exprimant les facteurs Cdx-2 et HNF1 α de manière inducible.....	66
3.3 Expression des marqueurs de différenciation intestinaux chez les HIEC Cdx-2 et HNF1 α inducibles.....	70
3.4 GATA-4 constitue un autre joueur clé dans la différenciation entérocytaire humaine.....	73
3.5 Génération et caractérisation de lignées HIEC double inducibles Cdx-2/HNF1 α avec ou sans expression de GATA-4.....	77

3.6	L'expression combinée de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 dirige spécifiquement la différenciation des HIEC vers la voie absorbante.....	81
3.7	Influence du facteur GATA-4 dans l'acquisition de propriétés morphologiques associées aux entérocytes.....	84
3.8	Analyse comparative des profils d'expression génétique des cellules HIEC exprimant les facteurs Cdx-2 et HNF1 α en présence et en absence de GATA-4..	87
3.9	L'initiation du processus de différenciation entérocytaire influence l'expression de certains marqueurs des cellules souches intestinales chez les HIEC.....	94
3.10	Rôle du polycomb Bmi-1 dans l'homéostasie des cellules cryptales HIEC.....	97
3.11	Caractérisation de l'expression du polycomb SUZ12 au niveau de la muqueuse intestinale humaine.....	100
3.12	L'abolition de l'expression du polycomb SUZ12 influence la prolifération et l'état de différenciation des cellules HIEC.....	104
3.13	L'abolition de SUZ12 accélère le programme de différenciation des cellules Caco-2/15.....	108
3.14	Analyse du profil d'expression génétique des cellules HIEC ^{IndHNF1α/Cdx-2} suivant l'altération de la machinerie polycomb.....	111
3.15	Variation des profils d'expression des récepteurs intégrines suite à l'induction de la différenciation entérocytaire.....	115
3.16	Caractérisation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ au niveau de l'épithélium intestinal humain.....	118
3.17	Rôle de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ au niveau de l'adhésion cellulaire, de l'organisation des points d'adhésion focaux et de l'assemblage des fibres de stress.....	121
3.18	L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ et l'activation de la GTPase RhoA.....	126
3.19	L'abolition de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ affecte la progression du cycle cellulaire.....	130
3.20	L'absence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ affecte le recrutement de la vinculine aux points d'adhésion focaux sans perturber la localisation de la paxilline.....	133
3.21	L'absence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ réduit la susceptibilité à l'anoïkose des cellules épithéliales intestinales indifférenciées.....	137
IV – Discussion et conclusions.....		146

4.1 Cdx-2 et HNF1 α déclenchent le programme de différenciation entérocytaire en collaboration avec GATA-4 chez les cellules épithéliales progénitrices humaines.....	147
4.2 Les complexes polycomb agissent à titre de répresseur de la différenciation entérocytaire au niveau de la crypte intestinale humaine.....	156
4.3 Influences de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ sur les fonctions biologiques responsables du maintien de l'homéostasie cryptale.....	160
4.4 Conclusions.....	168
V – Remerciements.....	170
VI – Références.....	172

Index des figures

Figure 1: L'axe crypte-villosité constitue l'unité fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin grêle.....	5
Figure 2: La différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	9
Figure 3: Les cellules souches intestinales.....	19
Figure 4: Mécanisme d'action des protéines du groupe polycomb.....	24
Figure 5: Les récepteurs intégrines.....	29
Figure 6: Les cellules indifférenciées des cryptes intestinales humaines n'expriment pas Cdx-2 et HNF1 α	65
Figure 7: Caractérisation des HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1 α au niveau de la prolifération cellulaire.....	69
Figure 8: Analyses RT-PCR de l'induction des marqueurs de différenciation entérocytaire chez les HIEC.....	72
Figure 9: Distribution du facteur GATA-4 dans la muqueuse intestinale humaine et son effet sur la prolifération cellulaire.....	76
Figure 10: Caractérisation des cellules HIEC ^{indHNF1α/Cdx-2} et l'impact d'une combinaison HNF1 α /Cdx-2/GATA-4 sur la différenciation fonctionnelle.....	79
Figure 11: Effet de l'expression combinée de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 dans la détermination du devenir cellulaire chez les HIEC.....	83
Figure 12: Observations des changements morphologiques induits par l'expression de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 chez les cellules HIEC.....	86
Figure 13: Caractérisation ultrastructurale de la morphologie des cellules HIEC exprimant les facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4.....	89
Figure 14: Analyse comparative des profils d'expression génétique des cellules HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1 α en présence et en absence de GATA-4.....	92
Figure 15: Influence des facteurs de transcription pro-différenciation sur l'expression des marqueurs de cellules souches/progénitrices intestinales.....	96
Figure 16: Implication du polycomb Bmi-1 chez les cellules HIEC.....	99

Figure 17: Expression du polycomb SUZ12 au niveau de la muqueuse intestinale humaine.....	103
Figure 18: L'abolition de l'expression de SUZ12 affecte la prolifération et l'expression de marqueurs de différenciation chez les HIEC.....	107
Figure 19: SUZ12 réprime le programme de différenciation entérocytaire chez les cellules Caco-2/15.....	110
Figure 20: Analyse comparative des profils d'expression génétique des cellules HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1 α en présence et en absence de SUZ12.....	114
Figure 21: Variation des niveaux d'expression des sous-unités intégrines suite à l'induction du processus de différenciation entérocytaire chez les HIEC....	117
Figure 22: Caractérisation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ au niveau de l'épithélium intestinal humain.....	120
Figure 23: Influence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ au niveau de l'adhésion cellulaire et de l'organisation du cytosquelette d'actine chez les cellules cryptales.....	125
Figure 24: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ et l'activation de la GTPase RhoA.....	129
Figure 25: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ et la progression du cycle cellulaire chez les cellules HIEC.....	132
Figure 26: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence la localisation de la vinculine mais n'affecte pas celle de la paxilline chez les cellules HIEC.....	136
Figure 27: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence l'induction des phénomènes apoptotiques chez les cellules HIEC en suspension.....	141
Figure 28: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence la transduction de signaux intracellulaires modulant la survie des cellules cryptales humaines HIEC.....	145

Index des Tableaux

Tableau-1: Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR standard et PCR
quantitatifs.....46

Tableau-2: Description des anticorps utilisés en immunobuvardage.....48

Tableau-3: Description des anticorps utilisés en immunofluorescence.....51

Tableau-4: Description des anticorps neutralisants utilisés en essais d’adhésion
cellulaire.....54

Tableau-5: L’ajout de GATA-4 au système Cdx-2/HNF1α augmente l’expression de
marqueurs fonctionnels de la polarité cellulaire chez les HIEC.....93

Tableau-6: Gènes associés à la différenciation cellulaire et modulés significativement
suite à l’abolition de SUZ12 chez les HIEC^{indHNF1α/Cdx-2} induites.....112

Tableau-7: Quantification des points d’adhésion focaux vinculine et paxilline
positifs.....137

Liste des abréviations

+4 LRC : +4 Label-retaining cells

ADNc : ADN complémentaire

ARNm : ARN messenger

BrdU : Bromodésoxyuridine

BSA : Bovine serum albumine

CBC : Crypt-Based Columnar cells

CNS : Contrôle non-silencieux

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

Dox : Doxycycline

DPPIV : Dipeptidyl peptidase IV

EGF : Epidermal Growth Factor

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HRP : Horseradish peroxydase

OptiMEM : Optimal Eagle's Minimum Essential Medium

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

PFA : Paraformaldéhyde

RGD : Arginine - Glycine - Aspartate

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

shRNA : Small hairpin RNA

Résumé

La muqueuse intestinale humaine représente un système dynamique constitué d'un épithélium simple en constant renouvellement qui repose sur un tissu conjonctif appelé mésenchyme ou stroma. Au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium est caractérisé, d'un point de vue fonctionnel, par la présence de cryptes et de villosités. Les villosités sont constituées de cellules pleinement différenciées tandis que les cryptes présentent, entre autres, une population de cellules progénitrices indifférenciées responsables du renouvellement de l'épithélium. Le maintien de la population de cellules progénitrices est assuré par des cellules souches somatiques multipotentes localisées à la base des compartiments cryptaux. Notre laboratoire a généré, en 1996, un modèle cellulaire non transformé qui présente toutes les caractéristiques des cellules épithéliales humaines de la crypte intestinale (HIEC). Ainsi, les cellules HIEC affichent un statut prolifératif tout en conservant un état totalement indifférencié. Mes travaux de doctorat ont démontré l'importance des facteurs de transcription Cdx2, HNF1 α et GATA-4 dans l'initiation du processus de différenciation entérocytaire chez les cellules HIEC. En effet, l'expression combinée de ces facteurs induit l'apparition de marqueurs de différenciation fonctionnelle, tels que la sucrase-isomaltase et la E-cadhérine, ainsi qu'une polarité cellulaire typique aux entérocytes. Ces travaux ont aussi permis de caractériser l'expression des

différents marqueurs spécifiques des cellules souches et progénitrices intestinales chez les HIEC, tels que Lgr5, Bmi-1, Musashi-1 ainsi que DCAMKL-1. L'étude du facteur Bmi-1, combiné à l'abolition du facteur SUZ12 par shRNA, a permis de mettre en évidence un mécanisme potentiel de préservation de l'auto-renouvellement et de l'état indifférencié chez les HIEC par l'action des groupes polycomb. L'expression forcée des facteurs de transcription pro-différentiation a aussi révélé une modulation de l'expression de certains récepteurs intégrines. C'est le cas de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$, dont l'expression cryptale est fortement réprimée lors de la différenciation entérocytaire. En effet, mes travaux portant sur ce récepteur ont permis de dévoiler sa présence *in vivo* chez les cellules progénitrices de l'épithélium intestinal humain. D'un point de vue fonctionnel, l'activation de $\alpha 8 \beta 1$ conduit à l'organisation adéquate des microfilaments d'actine, via un mécanisme RhoA/ROCK dépendant, afin de stimuler la prolifération tout en diminuant la motilité cellulaire dû à une adhésion rigide à la matrice extracellulaire. Ce processus est considéré important dans le positionnement des cellules souches/progénitrices au niveau de l'axe crypte-villosité. Finalement, l'étude des fonctions de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ a permis de démontrer l'existence d'un mécanisme de préservation de la susceptibilité à la mort cellulaire par perte d'attachement, ou anoïkose, chez les cellules souches/progénitrices intestinales humaines. Plus spécifiquement, mes travaux ont démontré l'importance de $\alpha 8 \beta 1$ dans le recrutement de la vinculine au niveau des points d'adhésion focaux afin d'empêcher l'activation constitutive de la kinase FAK. Ainsi, l'absence d'un tel récepteur intégrine au sein des cellules prolifératives et indifférenciées, comme

les cellules cancéreuses, favoriserait la transmission continue de signaux de survie par la voie FAK/PI3K qui supprime la susceptibilité de la cellule à l'anoïkose.

Mots clés : Intestin, épithélium, crypte, différenciation, intégrine, cellules souches

I - Introduction

1.1 La muqueuse intestinale humaine

D'un point de vue anatomique chez les mammifères, l'intestin est divisé en deux compartiments majeurs, soit l'intestin grêle et le colon. L'intestin grêle est constitué de trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Barker et al., 2008). Chacun se démarque par des différences physiologiques et morphologiques spécifiques, tant lors des différents stades de développement que chez l'adulte. La muqueuse intestinale humaine mature est constituée de trois principaux feuillets tissulaires, soit l'épithélium, le mésenchyme (ou stroma) ainsi que la muscularis mucosae. D'un point de vue fonctionnel, cette muqueuse est principalement impliquée dans la production et la sécrétion d'enzymes digestives ainsi que dans l'absorption des nutriments (Thomson et al., 2003a; Thomson et al., 2003b). L'épithélium intestinal constitue aussi un système hautement dynamique caractérisé par un renouvellement constant via le maintien d'une population de cellules prolifératives et indifférenciées. Ces caractéristiques font de la muqueuse intestinale un modèle de choix pour l'étude des diverses fonctions cellulaires.

L'épithélium intestinal repose sur la lamina propria, située au centre des villosités (Beaulieu, 1997). La lamina propria est un tissu conjonctif spécialisé (appelé

mésenchyme chez le fœtus et stroma chez l'adulte) et est constitué de fibroblastes, de myofibroblastes, de composantes du système nerveux périphérique ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Celle-ci joue un rôle crucial dans la fonctionnalité de l'intestin grêle par son implication dans divers mécanismes de communication moléculaire avec l'épithélium (Beaulieu, 1997). Autant par sa sécrétion de différents morphogènes qu'au niveau de sa contribution dans l'homéostasie de la lame basale, la lamina propria influence la régulation des différentes fonctions cellulaires de l'épithélium intestinal (Beaulieu, 1997; Lussier et al., 2000; Pageot et al., 2000).

1.2 L'épithélium de l'intestin grêle

À la surface luminale de l'intestin grêle, on retrouve un épithélium simple composé majoritairement de cellules absorbantes et polarisées qui canalisent les nutriments vers la circulation sanguine. L'intégrité de la couche épithéliale ainsi que la polarité des cellules qui la compose est maintenu grâce à différents complexes de jonctions cellulaires. Dans cette catégorie, on retrouve les jonctions serrées (*zonula occludens*), les jonctions adhérentes (*zonula adherens*) et les desmosomes (*macula adherens*). Ces complexes de jonctions cellulaires sont aussi grandement impliqués dans la gestion de la perméabilité sélective de l'épithélium intestinal (Gumbiner, 1996). Les différentes caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules épithéliales intestinales varient selon leur état de différenciation le long de l'axe crypte-villosité.

1.3 L'axe crypte villosité

Dans le but d'augmenter sa surface de contact avec le bol alimentaire, la muqueuse de l'intestin grêle démontre une organisation en projections digitiformes appelées villosités (Figure 1). Au niveau du duodénum, les villosités sont longues et larges et elles diminuent de taille au fur et à mesure qu'on se déplace vers l'extrémité caudale de l'intestin grêle. Situées tout autour des villosités, on retrouve des structures tubulaires creuses appelées cryptes de Lieberkühn (Ménard et al., 2006). Chaque villosité est en moyenne entourée de six cryptes et c'est l'ensemble de ces deux structures, soit la crypte et la villosité, qui constitue l'unité fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin grêle (Figure 1).

Cette unité fonctionnelle est donc organisée sous forme de deux compartiments distincts. D'une part, la crypte est principalement associée à un phénotype prolifératif impliquant des cellules indifférenciées et en cours de spécialisation tandis que la villosité présente une population de cellules pleinement différenciées (Figure 1). C'est par le maintien d'un tel équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire que l'axe crypte-villosité assure un renouvellement rapide et constant de l'épithélium intestinal (Babyatsky et Podolsky, 1999; Ménard et al., 2006).

Figure 1: L'axe crypte-villosité constitue l'unité fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin grêle

L'intestin grêle humain consiste en un tube dont la structure extérieure est composée de tissus musculaires tandis que sa surface luminale présente un épithélium simple composé majoritairement de cellules cylindriques et polarisées exerçant une fonction d'absorption des nutriments. Dans le but d'augmenter sa surface de contact avec ce bol alimentaire, la muqueuse de l'intestin grêle démontre une organisation en projections digitiformes appelées villosités. Les villosités sont entourées de structures tubulaires creuses appelées cryptes de Lieberkühn. C'est l'ensemble de ces deux structures, crypte et villosité, qui constitue l'unité fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin grêle. L'épithélium intestinal repose sur la lamina propria ou compartiment mésenchymateux, situé au cœur des villosités et dans lequel on retrouve entre autres des myofibroblastes. La crypte est principalement associée à un phénotype indifférencié et prolifératif (Tiers inférieur), prolifératif et en cours de spécialisation (Tiers médian) et en différenciation terminale (Tiers supérieur) tandis que la villosité présente une population de cellules pleinement différenciées. C'est par le maintien d'un tel équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire, conjugués à un processus de migration constant que l'axe crypte-villosité assure un renouvellement rapide de l'épithélium intestinal.

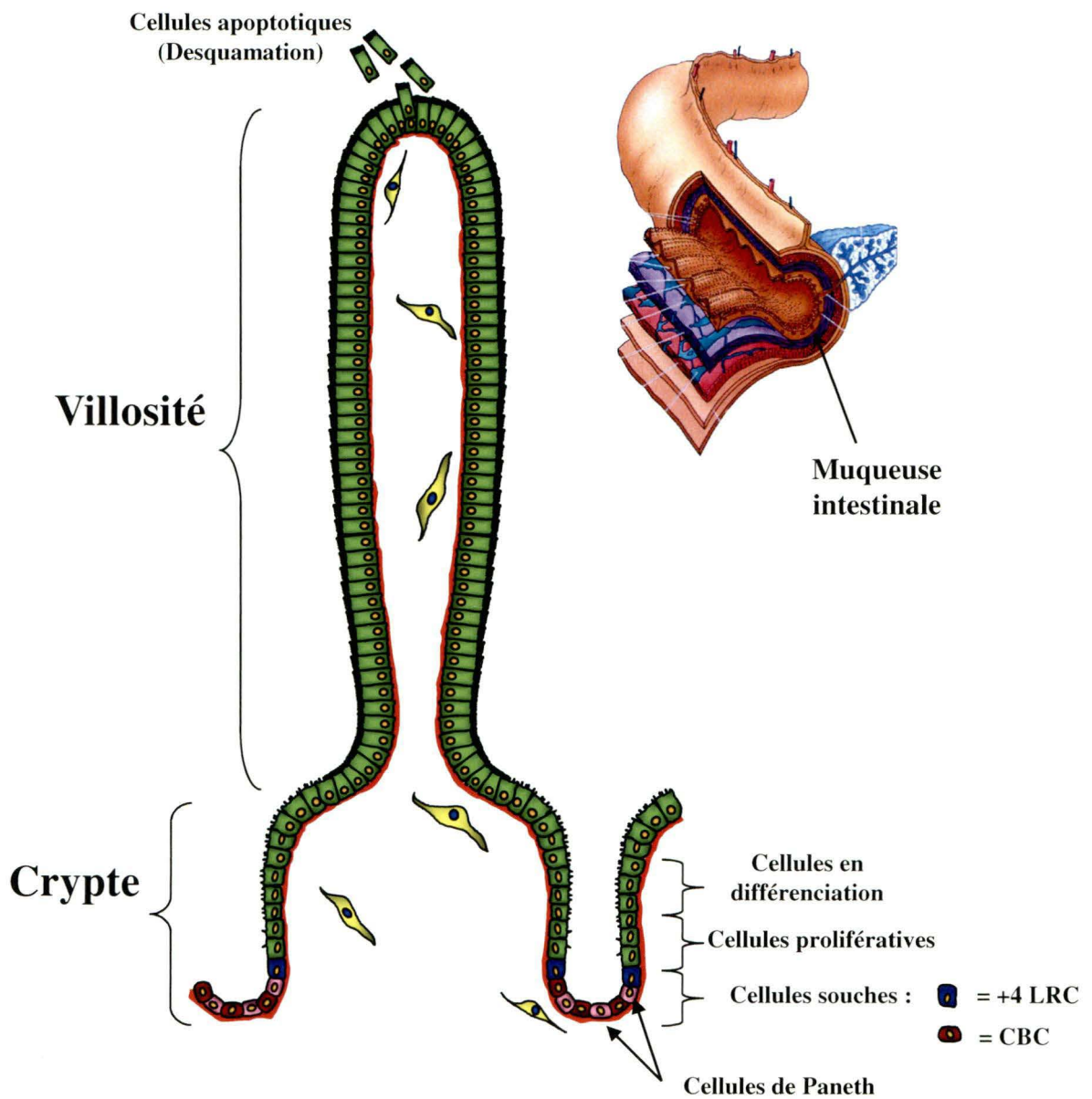


Figure-1: L'axe crypte-villosité constitue l'unité fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin grêle

Chez l'humain, la période nécessaire au renouvellement complet de l'épithélium de l'intestin grêle est d'environ 3 à 5 jours. Afin de soutenir ce renouvellement constant de l'épithélium intestinal, la persistance d'une population de cellules prolifératives et indifférenciées doit être assurée tout au long de la vie de l'organisme. En effet, différentes études ont démontrés que le maintien d'une telle population de cellules dans les cryptes est assuré par la division asymétrique de cellules souches pluripotentes. Celles-ci sont situées à la base des cryptes et leurs principales caractéristiques seront discutées plus en détails subséquemment (Bjerknes et Cheng, 2005; Bjerknes et Cheng, 2006).

1.4 La différenciation entérocytaire

Les fonctions de digestion et d'absorption de l'intestin grêle sont étroitement reliées à la spécialisation de certaines cellules épithéliales. Celles-ci doivent acquérir une capacité à produire une multitude de transporteurs et d'enzymes digestives, tout en préservant la perméabilité sélective de la barrière épithéliale. La spécialisation terminale de ces cellules est l'œuvre d'un processus nommé différenciation cellulaire. D'une part, les cellules prolifératives retrouvées au niveau des deux premiers tiers de la crypte migreront de manière ascendante le long de l'axe crypte-villosité. Ensuite, elles poursuivront leur processus de différenciation au niveau du tiers supérieur du compartiment cryptal (Pageot et al., 2000). Ainsi, les cellules en voie de différenciation perdent leur capacité à proliférer (Beaulieu, 1999). Suite à la division asymétrique des cellules souches

intestinales, les cellules filles déterminées à se différencier seront dirigées vers l'une des deux grandes voies de différenciation de l'intestin grêle, soit la voie sécrétrice ou la voie absorbante (Figure 2). À ce niveau, le ratio du nombre de cellules se dirigeant vers chacune de ces voies est finement régulé par l'action de la voie de signalisation Notch. Celle-ci constitue une cascade décisionnelle du devenir cellulaire régulée par le clivage protéolytique des récepteurs Notch activés (Sancho et al., 2003). La gamma-sécrétase constitue un enzyme clé dans le clivage du domaine intracellulaire des récepteurs Notch activés. Des expériences faisant intervenir des inhibiteurs de cet enzyme ont démontré l'importance d'un équilibre entre l'expression des facteurs de transcription Hath-1 et Hes-1 dans le maintien de ratios adéquats entre la différenciation absorbante et sécrétrice. Plus spécifiquement, l'expression prédominante de Hes-1 sur Hath-1, caractérisée par l'activation de Notch1, amène la cellule à se déterminer en cellule absorbante (Figure 2). À l'opposé, l'absence d'activation du récepteur Notch1 ou l'inhibition du clivage de son domaine C-terminal favorise une expression de Hath-1 plus élevée que celle de Hes-1 et une détermination vers la voie sécrétrice (Okamoto et al., 2009; van Es et al., 2005). Au total, quatre principaux types de cellules émergeront du processus de différenciation cellulaire intestinal (Figure 2).

Figure 2: La différenciation des cellules épithéliales intestinales

La division asymétrique des cellules souches intestinales conduit à l'émergence de cellules filles qui seront déterminées à se différencier. Elles seront dirigées vers l'une des deux grandes voies de différenciation de l'épithélium de l'intestin grêle, soit la voie sécrétrice ou la voie absorbante. Le ratio du nombre de cellules se dirigeant vers chacune de ces voies est finement régulé par l'action de la voie de signalisation Notch. Une expression prédominante de Hes-1 sur Hath-1, découlant de l'activation de Notch1, amène la cellule à se déterminer en cellule absorbante. À l'opposé, l'absence d'activation du récepteur Notch1 ou l'inhibition du clivage de son domaine C-terminal favorise une expression de Hath-1 plus élevée que celle de Hes-1 et une détermination vers la voie sécrétrice. Les quatre principaux types cellulaires issus de la différenciation intestinale sont : 1) les entérocytes, qui constituent le type le plus abondant, 2) les cellules caliciformes, 3) les cellules entéroendocrines et 4) les cellules de Paneth. Selon de récentes études, les facteurs de transcription Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 sont pressenti pour un rôle prépondérant dans l'enclenchement du processus de différenciation des entérocytes chez l'humain.

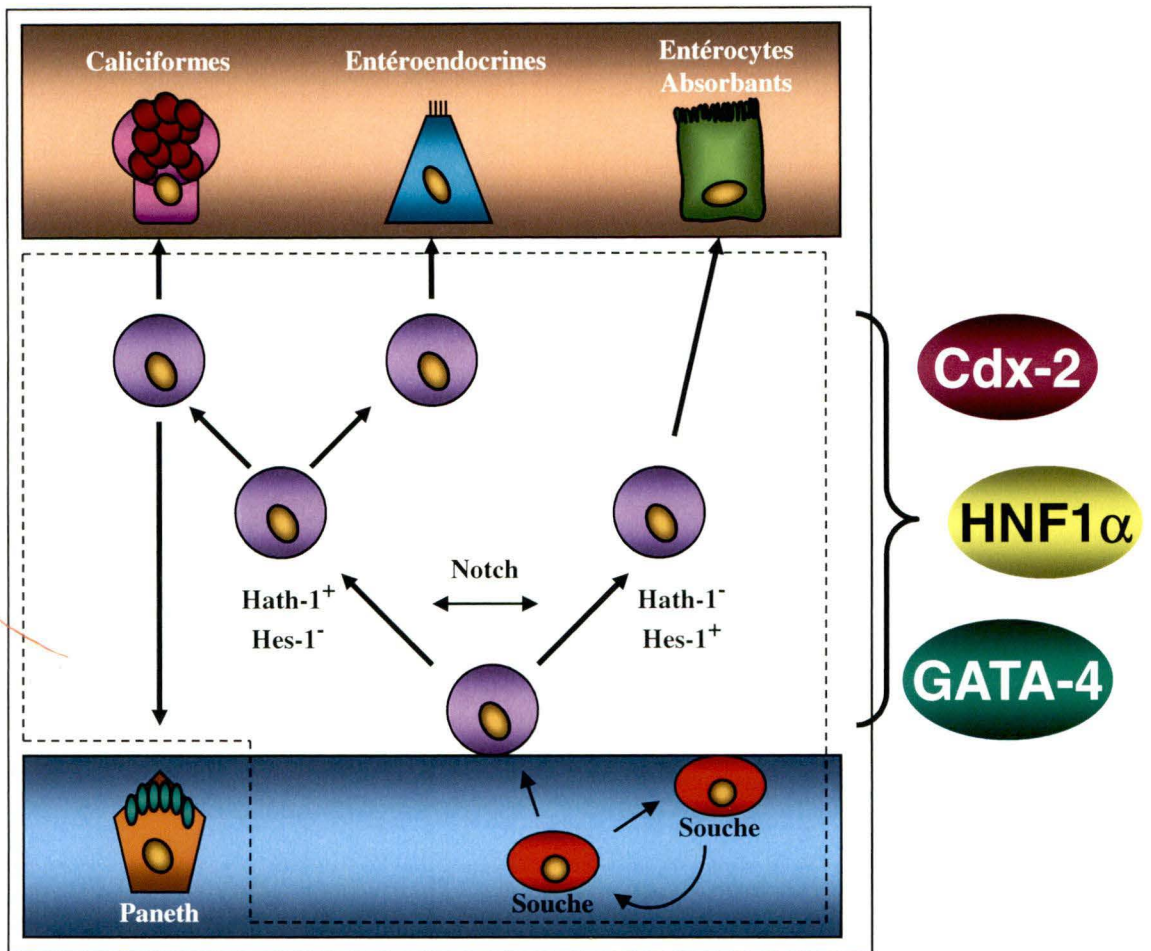


Figure-2: La différenciation des cellules épithéliales intestinales

Environ 80% des cellules de l'épithélium intestinal vont acquérir un phénotype absorbant. La voie sécrétrice donnera lieu à trois autres types cellulaires, soit 1) les cellules caliciformes qui sont responsable de la sécrétion de mucines protégeant l'épithélium contre l'abrasion, 2) les cellules entéroendocrines responsables de la sécrétion d'hormones digestives, puis 3) les cellules de Paneth qui possèdent une fonction antimicrobienne (Sancho et al., 2003; Vidrich et al., 2003). Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle, à l'exception des cellules de Paneth, continueront leur processus de migration ascendante le long de l'axe crypte-villosité jusqu'à l'apex de la villosité où elles sont éliminées par apoptose. Pour ce qui est des cellules de Paneth, celles-ci migrent plutôt vers le fond de la crypte (Barker et al., 2008).

C'est maintenant bien connu que la différenciation des cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité est largement dépendante de diverses interactions avec le stroma sous-jacent. Ce dernier est impliqué dans la régulation d'une panoplie de mécanismes complexes de signalisation cellulaire (Auclair et al., 2007; Teller et al., 2007). Ces phénomènes peuvent entraîner une reprogrammation de certains patrons d'expression génétiques via l'action concertée de divers facteurs de transcription (Fang et al., 2006; Katz et al., 2002; Lussier et al., 2008; Walters, 2005). Le facteur de transcription Cdx-2 appartient à la catégorie de gènes de type homéobox chez les mammifères et se rapporte au gène *caudal* chez la drosophile (Duprey et al., 1988; James et Kazenwadel, 1991). Cdx-2 a été démontré comme étant essentiel à l'induction d'une différenciation et d'une polarisation entérocytaire partielle chez les cellules de rat immortalisées IEC-6 (Suh et Traber, 2005).

1996). Des analyses diverses, autant par micropuces d'ADN que par gain ou perte de fonction chez la souris, ont démontré que Cdx-2 avait la capacité d'augmenter l'expression de molécules impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, comme la Li-cadhérine, la E-cadhérine, la sous-unité intégrine $\beta 4$, l' α -actinine et la claudine-2 (Hinoi et al., 2002; Lorentz et al., 1997; Sakaguchi et al., 2002; Uesaka et al., 2004). Ces observations ont alors supporté l'idée que Cdx-2 pourrait constituer un facteur de transcription central dans le déclenchement du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales (Gao et al., 2009). De plus, il a été démontré que des interactions physiques entre Cdx-2 et d'autres facteurs de transcription, tels que HNF-1 α et GATA-4, sont nécessaires à l'expression de certains gènes étroitement associés à la différenciation entérocytaire. Parmi ces gènes, on retrouve la sucrase-isomaltase et la lactase-phlorizine hydrolase (Bosse et al., 2006b; Boudreau et al., 2002; Gu et al., 2007; Krasinski et al., 2001; Mitchelmore et al., 2000; Troelsen, 2005; van Wering et al., 2004). Le facteur de transcription HNF-1 α a aussi été démontré comme ayant un rôle crucial dans la transactivation de certains gènes liés à la différenciation entérocytaire tels que la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) et la «fatty acid binding protein» intestinale ou iFABP (Bosse et al., 2007; Erickson et al., 1999). Dans ce sens, la coopération entre les facteurs de transcription Cdx-2, HNF-1 α et GATA-4 pourrait aussi être requise au déclenchement d'un patron d'expression génétique spécifique menant à la différenciation entérocytaire (Figure 2). Par le passé, le groupe du Dr Beaulieu a démontré que les effets de Cdx-2 sur les cellules épithéliales de la crypte se limitaient essentiellement à l'altération de la

prolifération cellulaire (Escaffit et al., 2006). Ces observations indiquent ainsi une distinction fondamentale entre l'action de Cdx-2 dans les cellules cryptales humaine et le rôle de ce même facteur de transcription dans un modèle issu du rat, soit les cellules IEC-6 où il est en mesure à lui seul d'induire la différenciation entérocytaire (Suh et Traber, 1996). Toutefois, il est important de mentionner que les cellules IEC-6, contrairement au modèle de cellules normales humaines HIEC (Escaffit et al., 2005a), expriment des niveaux endogènes considérables de certains autres facteurs de transcription pro-différenciation comme HNF1 α et GATA-4 (Lussier et al., 2008). Ces données suggèrent donc que l'action concertée de facteurs de transcription tels que Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 pourrait participer à l'enclenchement du processus de différenciation entérocytaire chez l'humain.

1.5 Les cellules souches

Les cellules souches constituent une population cellulaire possédant deux grandes particularités : 1) une capacité à s'auto-renouveler, soit la conservation de leur potentiel développemental suivant chaque division cellulaire, ainsi que 2) un caractère pluripotent ou multipotent. Cette dernière particularité représente une aptitude à se différencier en plusieurs types cellulaires en fonction des influences de l'environnement cellulaire (Li et Clevers, 2010). C'est aussi l'architecture de la niche de la cellule souche qui dictera sa division asymétrique en une cellule fille déterminée et une nouvelle cellule souche. Dans certains cas, lorsque la nécessité

de renouveler une population de cellules souches est présente, celles-ci peuvent se diviser de façon symétrique (Barker et al., 2008). Ce même phénomène s'applique aussi au cas des stades plus précoces de l'embryogénèse. En effet, au stade du blastocyste qui correspond aux alentours des 5^e et 6^e jours post-fécondation, la masse cellulaire interne de l'embryon humain est constituée de cellules souches pluripotentes issues de divisions symétriques. Ces cellules souches ont le potentiel de se différencier en tous les types cellulaires présents chez l'adulte. Thomson et ses collaborateurs ont démontré que des cellules souches pluripotentes pouvaient être isolées et mise en culture à partir de blastocystes humains (Thomson et al., 1998). Par la suite, des études ont rapporté qu'il était possible d'orienter la différenciation de ces cellules souches embryonnaires vers tous les types cellulaires de l'organisme tels que les neurones, les cellules musculaires ou les cellules hématopoïétiques, en fonction d'un microenvironnement défini et de la présence de facteurs de croissance spécifiques (Gokhale et Andrews, 2009). Cette nouvelle percée fût accueillie avec beaucoup d'enthousiasme considérant l'ouverture d'un grand nombre de nouvelles perspectives en médecine régénérative. Toutefois, l'étude des cellules souches embryonnaire humaine a progressé au ralenti au cours des années 2000 en raison de problèmes éthiques et légaux se rapportant à la destruction de l'embryon suite au prélèvement de cellules de la masse interne du blastocyste. Cependant, une approche intéressante, ayant été développée vers la fin des années 2000, permettant de reprogrammer une cellule adulte en cellule souche embryonnaire pluripotente. En effet, l'expression coordonnée d'un réseau de facteurs de transcription incluant

NANOG, Oct4 et Sox2 chez les cellules souches embryonnaires contribuerait au maintien de leur potentiel d'auto-renouvellement ainsi que de leur caractère pluripotent (Kashyap et al., 2009). L'expression combinée de ces trois facteurs de transcription, en compagnie du facteur Lin28 chez des fibroblastes adultes, conduit à la reprogrammation du profil d'expression génétique et entraîne l'induction d'un phénotype souche pluripotent. Dans la littérature, cette procédure expérimentale est appelée iPS ou «Induced Pluripotent Stem cells» (Hochedlinger et Plath, 2009). Aux stades plus avancés du développement fœtal, les différents organes en formation présentent aussi des populations de cellules souches multipotentes dont le potentiel de différenciation future est déjà déterminé en fonction du système dans lequel elles résident. Ce phénomène est aussi présent chez l'adulte où l'on retrouve des cellules souches multipotentes indifférenciées ayant la capacité, en cas de blessure, de régénérer les différents tissus qu'elles constituent. Des exemples de ce phénomène sont retrouvés chez les cellules souches musculaires et hépatiques (Kung et Forbes, 2009; Perdiguero et al., 2009). De plus, il a été démontré que la majorité des types de cellules souches adultes identifiées se retrouvent dans un état de quiescence (Arai et al., 2004; Cotsarelis et al., 1990; Potten et al., 1997). L'étude des cellules souches fœtales et adultes a grandement progressée depuis la mise au point de techniques en cytométrie de flux permettant d'isoler ces cellules à partir de biopsies et de tissus complets. Plus particulièrement, certains types de cellules souches sont isolés d'après leur capacité à expulser, vers l'extérieur du cytoplasme, des composés chimiques tels que des agents chimiothérapeutiques et des colorants comme le

Hoechst 33342 via l'activité du transporteur ABCG2. Plusieurs études impliquant l'isolement de telles populations ont permis un avancement significatif de l'étude des cellules souches adultes (Gokhale et Andrews, 2009).

Dans certains systèmes et organes en renouvellement constant, comme le sang, les follicules pileux et l'épithélium intestinal, il a été démontré que la dynamique des cellules souches est finement régulée afin de maintenir un équilibre entre la persistance d'une population de cellules progénitrices prolifératives et la différenciation subséquente de celles-ci (Li et Clevers, 2010; Scoville et al., 2008). On peut se demander comment la production de milliards de cellules sanguines et intestinales peut être soutenue par des populations de cellules souches quiescentes. Ce phénomène est attribuable à la coexistence dans ces tissus de deux populations distinctes de cellules souches. Bien entendu, on y retrouve une population quiescente mais aussi une population en division constante qui possède aussi une capacité d'auto-renouvellement à long terme (Li et Clevers, 2010).

1.6 Les cellules souches intestinales

L'existence des cellules souches intestinales a d'abord été démontrée par des expériences dans des modèles de souris mutantes, qui ont contribué à mettre en évidence la nature monoclonale de la crypte intestinale. En effet, une cellule souche intestinale a la capacité de s'auto-renouveler tout en conservant un potentiel à se différencier en chacun des 4 principaux types cellulaires de l'intestin

grêle une fois hors de sa niche (Barker et al., 2008). Il a aussi été démontré que les cellules souches intestinales ont la capacité, suite à une blessure intestinale comme une exposition aux radiations ou à la chimiothérapie, à se diviser de façon symétrique afin de restaurer leur propre population (Booth et Potten, 2000). Cependant, la localisation exacte des cellules souches intestinales dans la crypte a été l'objet d'une controverse au cours des 30 dernières années (Bjerknes et Cheng, 2006). Initialement, en 1974, la localisation des cellules souches intestinales a été proposée entre les positions cellulaires 1 à 4 de la crypte, entre les cellules de Paneth plus spécifiquement. Ces cellules furent nommées «*Crypt-Based Columnar cells*» ou CBC (Cheng et Leblond, 1974). Toutefois, en 2002 Potten et ses collaborateurs ont utilisé une technique d'incorporation de BrdU, un analogue synthétique de la thymidine, afin de mettre en évidence la localisation des cellules souches intestinales. Ces expériences permirent de démontrer la présence de cellules souches intestinales localisées en position cellulaire +4 dans la crypte, soit juste au dessus des cellules de Paneth (Marshman et al., 2002). Jusqu'en 2007, la localisation généralement acceptée des cellules souches intestinales dans la littérature était en position +4. Cependant, l'identification de nouveaux marqueurs de cellules souches tel que Lgr5, qui a été montré comme étant spécifique à certaines cellules en division active et imbriquées entre les cellules de Paneth, a relancé le débat sur le positionnement réel des cellules souches intestinales (Barker et al., 2007). Plus particulièrement, il a été démontré chez la souris que les cellules Lgr5 positives étaient multipotentes pour tous les types cellulaires matures de l'épithélium intestinal en plus de pouvoir persister pendant

60 jours en culture. Ces mêmes cellules sont aussi résistantes aux radiations. En 2008, le groupe de Capecchi démontra l'expression spécifique du facteur polycomb Bmi-1 chez les cellules en position +4 de la crypte intestinale chez la souris. Le rôle de Bmi-1 a été largement caractérisé dans le maintien du potentiel d'auto-renouvellement et dans la prévention de la sénescence chez les cellules souches embryonnaires et hématopoïétiques. Ainsi, il a été démontré que Bmi-1 représente un marqueur spécifique des cellules épithéliales de la crypte en position +4. Ces mêmes cellules détiennent aussi une capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en chacun des 4 principaux types cellulaires de l'épithélium intestinal (Sangiorgi et Capecchi, 2008). De plus, ces mêmes cellules en position +4 ont été démontrées comme étant principalement quiescentes ou en division très lente (Scoville et al., 2008). L'ensemble des nouvelles découvertes sur les cellules souches intestinales a conduit à la réconciliation de deux grandes théories sur le sujet. D'une part, les cellules CBC responsables du maintien de la population de progéniteurs indifférenciés qui soutiennent le renouvellement constant de l'épithélium, tandis que les cellules en position +4, moins affectées par le stress environnemental dû à leur état quiescent, serviraient de gardiennes prêtes à régénérer les CBC en cas de blessure (Figure 3) (Li et Clevers, 2010; Scoville et al., 2008). À présent, la coexistence de deux populations de cellules souches distinctes dans la crypte intestinale est bien acceptée comme c'est le cas dans d'autres systèmes comme le follicule pileux et le système hématopoïétique.

Figure 3: Les cellules souches intestinales

Les cellules souches intestinales sont localisées à la base des cryptes et ont la capacité de s'auto-renouveler tout en conservant le potentiel de se différencier en chacun des 4 principaux types cellulaires de l'intestin grêle. Les cellules souches CBC (rouges) sont localisées à la base des cryptes, imbriquées entre les cellules de Paneth et sont caractérisées par des taux de prolifération élevés. Les cellules souches en position +4 (bleues) sont généralement associées à un état quiescent et agissent à titre de «gardiennes» prêtes à régénérer les CBC en cas de blessure. Les cellules CBC possèdent aussi l'habilité de régénérer la population de cellules souches en position +4 en cas de stress ou de blessure. L'identification récente de nouveaux marqueurs spécifiques des cellules souches intestinales a permis une meilleure définition des deux populations souches distinctes coexistantes au sein de la crypte. Les marqueurs Bmi-1 et DcamKL1 sont associés aux cellules en position +4 tandis que Lgr5 est spécifiques aux cellules CBC.

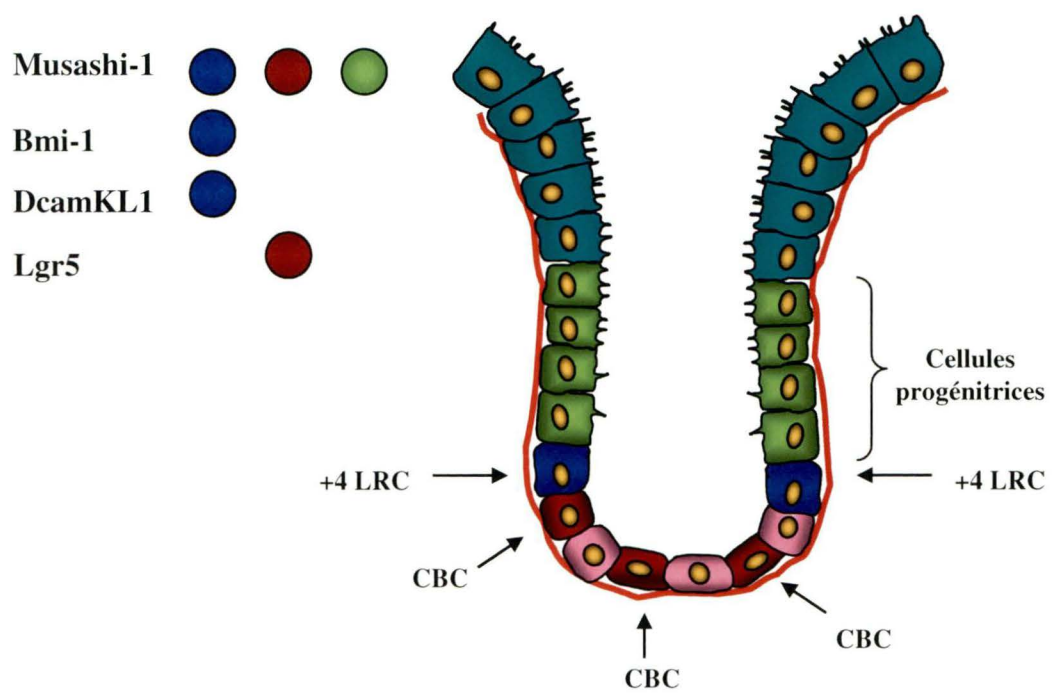


Figure-3: Les cellules souches intestinales

Les recherches sur les cellules souches intestinales ont été ralenties au cours des 15 dernières années dû à un manque de marqueurs spécifiques permettant leur identification et leur localisation. Toutefois, la fin des années 2000 fût marquée par l'identification de plusieurs nouveaux marqueurs relativement spécifiques à chacune des deux populations de cellules souches intestinales. Un des premiers marqueurs potentiels des cellules souches intestinales à avoir été largement caractérisé fut la protéine d'interaction avec l'ARN messager Musashi-1 (Potten et al., 2003). Néanmoins, l'étude plus approfondie de Musashi-1 a démontré que sa présence n'était pas uniquement restreinte aux cellules souches en position +4 mais plutôt à l'ensemble des cellules indifférenciées de la crypte (Figure 3). Par la suite, l'activité du récepteur BMPR1a, se traduisant par la phosphorylation des effecteurs Smad-1,5 et 8 ainsi que de PTEN, ainsi que la phosphorylation de la β -caténine sur la sérine 552 ont été associées aux cellules en position +4 dans la crypte intestinale (He et al., 2004). D'autres marqueurs spécifiques à ce type de cellules souches intestinales tels que DcamKL1 et Bmi-1 ont ensuite été identifiés (Figure 3). En contre partie, le marqueur Lgr5 a été spécifiquement associé aux cellules souches CBC situées au fond des cryptes (Figure 3) (Montgomery et Breault, 2008; Montgomery et Shivdasani, 2009). Jusqu'à présent, les rôles exacts de chacun de ces marqueurs ne sont pas clairement connus mais considérant leur présence au niveau des cellules souches intestinales, il est possible de croire qu'ils pourraient exercer diverses fonctions dans le maintien de l'état indifférencié et du potentiel d'auto-renouvellement.

1.7 Les protéines du groupe polycomb

Les mécanismes moléculaires permettant à la cellule souche de préserver son caractère pluripotent et son état indifférencié ont suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières années. Il est maintenant clair que des phénomènes épigénétiques sont au cœur d'une telle régulation. L'épigénèse en son sens propre, consiste en l'ensemble des modifications génétiques réversibles et transmissibles d'une génération à l'autre sans qu'il y ait altération des séquences nucléotidiques. Le père de l'épigénèse moderne, le biologiste Conrad Waddington, l'a d'abord décrite comme l'interaction entre les systèmes génétiques et leur environnement dans l'acquisition d'un phénotype propre à un individu. Ainsi, les cellules souches interagissent avec leur microenvironnement afin de préserver un phénotype indéterminé réversible et dépendant du code histone (Nightingale et al., 2006). Les protéines du groupe polycomb (PcG) ont été étudiées de manière exhaustive pour leur rôles exercés dans le maintien de l'auto-renouvellement et de l'état indifférencié chez les cellules souches embryonnaires (Boyer et al., 2006; Chamberlain et al., 2008; Kashyap et al., 2009; Lee et al., 2006; Walker et al., 2010). À l'inverse, les protéines du groupe trithorax ont été identifiées comme ayant un effet inverse à celui des polycombs dans le même contexte (Soshnikova et Duboule, 2009). Dans le but de prévenir l'activation transcriptionnelle de certains gènes, les polycombs établissent un patron spécifique de modifications épigénétiques, telles que l'ajout de groupements méthyles sur la queue des histones, au niveau de la chromatine de leurs gènes cibles (Kirmizis et al., 2004).

L'introduction de telles modifications au niveau de la chromatine contribue ainsi à la mise en place du code histone qui dicte à son tour l'activation ou la répression transcriptionnelle de certains gènes sans en affecter la séquence de l'ADN en soit. Chez la drosophile, les polycombs reconnaissent leurs gènes cibles par la présence d'éléments de réponse aux polycombs ou PRE au niveau des promoteurs de ces gènes. Toutefois, la présence de tels éléments de réponse n'a pas été conservée chez les mammifères. Bien que le mode de reconnaissance des gènes cibles par les polycombs chez l'humain reste nébuleux, certains groupes proposent tout de même que la présence des facteurs de pluripotence tels que NANOG, Oct4 et Sox2, au niveau de certains promoteurs pourrait dicter le recrutement des complexes polycomb (Kashyap et al., 2009).

En conditions physiologiques, les protéines du groupe polycomb sont regroupées sous forme de deux grands complexes. Premièrement, on retrouve le complexe répresseur de type-2 ou PRC2 qui est reconnu comme étant l'initiateur de la répression épigénétique, par son effet catalyseur de l'ajout de trois groupements méthyles sur la lysine 27 de l'histone H3 (Figure 4). Il y a aussi le complexe répresseur de type-1 ou PRC1, qui est responsable du maintien de la répression des gènes cibles via l'induction de l'ubiquitinylation des histones et le recrutement d'ADN méthyltransférases (Figure 4) (Sparmann et van Lohuizen, 2006). Ainsi, le complexe PRC2 établit d'abord une signature moléculaire précise au niveau des promoteurs des gènes cibles principalement caractérisée par l'ajout d'une fonction tri-méthyle sur la lysine 27 de l'histone H3

Figure 4: Mécanisme d'action des protéines du groupe polycomb

Les protéines du groupe polycomb sont regroupées sous forme de deux grands complexes, soit le PRC2 et le PRC1. Le complexe PRC2 est composé de trois protéines centrales, soit EED, EZH2 et SUZ12 et joue un rôle d'initiateur de la répression épigénétique par son effet catalyseur de l'ajout de groupements méthyles sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27). Pour sa part, le complexe PRC1 est responsable du maintien de la répression des gènes cibles via l'induction de l'ubiquitinylation des histones et le recrutement de DNA méthyltransférases.

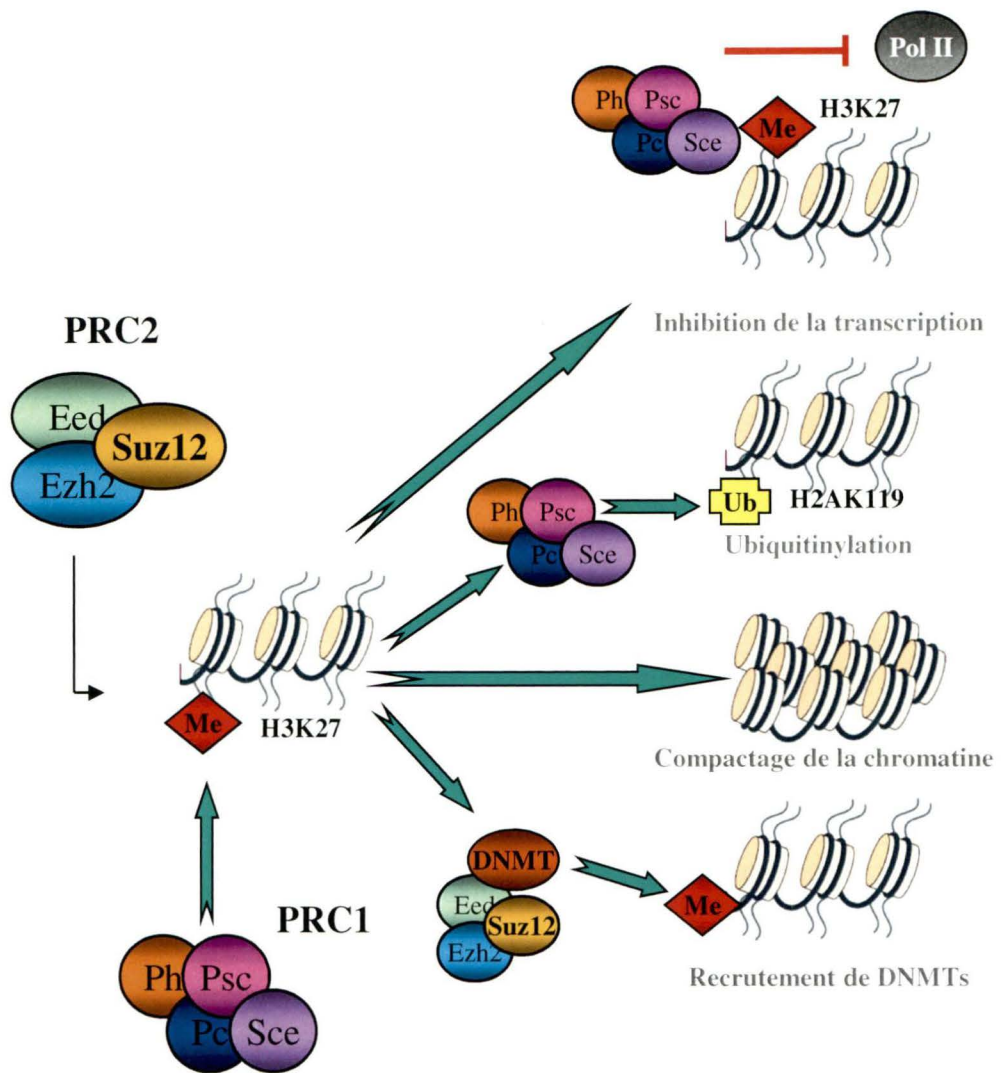


Figure-4: Mécanisme d'action des protéines du groupe polycomb

(H3K27me3), puis cette signature sera ensuite reconnue par le complexe PRC1 qui viendra s'y associer. Le complexe PRC2 est composé de trois protéines centrales, soit EED, EZH2 et SUZ12. D'une part, l'association entre EED et EZH2 a été démontrée comme étant cruciale à l'activité histone méthyltransferase du complexe ainsi qu'au recrutement subséquent du complexe PRC1 au niveau des gènes cibles. De plus, SUZ12 a été démontré comme étant le pivot de l'assemblage et de la fonctionnalité du complexe PRC2 en soit (Cao et Zhang, 2004). Des études de cartographie génomique ont révélé la présence du facteur SUZ12 au niveau d'un large éventail de promoteurs de gènes encodant des facteurs de transcription pro-différentiation. L'expression de ces mêmes facteurs de transcription se trouve réprimée chez les cellules souches embryonnaires. Spécifiquement, SUZ12 occupe et réprime la transactivation des promoteurs de divers gènes régulateurs du développement tels que les familles HOX, GATA, CDX, ATOH, SOX et PAX (Lee et al., 2006). Bmi-1 constitue un autre membre des polycomb dont la fonction a été largement étudiée chez les cellules souches embryonnaires et hématopoïétiques. Ce membre du complexe PRC1 a été démontré comme étant un répresseur transcriptionnel du locus *INK4/ARF* qui encode des inhibiteurs du cycle cellulaire p15 et p16 qui sont fréquemment associés à l'état de sénescence cellulaire (Smith et al., 2003). De plus, l'expression de Bmi-1, qui est régulée en partie par la voie de signalisation Hedgehog, serait essentielle au maintien de la capacité à l'auto-renouvellement chez différents types de cellules souches (Liu et al., 2006; Wang et al., 2010). Considérant l'étude détaillée du rôle des groupes polycombs dans le maintien du

caractère souche au niveau de l'embryon et de certains tissus adultes, rien n'est encore connu concernant la participation potentielle d'un tel mécanisme de régulation transcriptionnelle chez les populations de cellules progénitrices indifférenciées, comme les cellules cryptales de l'épithélium intestinal humain.

1.8 La matrice extracellulaire et les intégrines

L'épithélium intestinal représente un système de choix dans l'étude des relations existantes entre l'état cellulaire et les diverses interactions de cette cellule avec son microenvironnement. Située à l'interface de l'épithélium et du mésenchyme intestinal, la lame basale constitue un mince feuillet composé de divers éléments de matrice extracellulaire. Celle-ci comprend les réseaux de collagène de type IV et de laminines auxquels s'associent des protéoglycans et d'autres glycoprotéines comme la fibronectine (Beaulieu, 1997; Leblond et Inoue, 1989). La lame basale contribue grandement à l'interaction entre les compartiments épithéliaux et mésenchymateux autant par l'interaction entre celle-ci et différents récepteurs de surface que par sa capacité à influencer les concentrations effectives de certains facteurs solubles (Adams et Watt, 1993; Beaulieu, 1997; Beaulieu, 1999). Ainsi dans le contexte de l'axe crypte-villosité, les fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire sont susceptibles de subir une régulation dictée par l'interaction spécifique de certains récepteurs intégrines avec différentes composantes de la matrice extracellulaire (Beaulieu, 1997; Beaulieu, 1999; Zargham et al., 2007b).

Les intégrines constituent une superfamille de récepteurs transmembranaires et sont formés par une hétérodimérisation non-covalente entre une sous-unité intégrine α et une sous-unité β (Beaulieu, 1999). Chez les mammifères, plus de 24 hétérodimères intégrines différents ont été caractérisés suite à l'identification de 18 sous-unités α et de 9 sous-unités β différentes (Figure 5). Les récepteurs intégrines agissent principalement comme lien structural et fonctionnel entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire afin de réguler la transduction de différents signaux intracellulaires (Figure 5) (Bershadsky et al., 2006; Clark et Brugge, 1995). Un grand nombre de récepteurs intégrines sont reconnu pour être présents au sein de différents épithéliums à travers l'organisme. Parmi ceux-ci, on compte entre autres les intégrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, et $\alpha6\beta4$ (Beaulieu, 1999; Dydensborg et al., 2009). La présence de ces intégrines à la membrane des cellules épithéliales permet la reconnaissance de différents éléments du microenvironnement cellulaire, tels que les laminines, les collagènes ainsi que d'autres glycoprotéines (Beaulieu, 1997; Mercurio, 1995; Sheppard, 1996). La connexion intégrine-dépendante entre la matrice extracellulaire et le cytoplasme permet la régulation de certaines fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la migration, la prolifération, l'apoptose et la différenciation (Giancotti, 1997; Lock et al., 2008; Reddig et Juliano, 2005). Outre les interactions classiques entre les intégrines et les différents types de collagènes et les laminines, les cellules épithéliales intestinales ont aussi démontrées, dans certains contextes particuliers, l'expression de certains récepteurs intégrines moins connus. C'est le cas de l'intégrine $\alpha9\beta1$, qui constitue un récepteur spécifique de la tenascine-C et de

Figure 5: Les récepteurs intégrines

Les récepteurs intégrines représentent une superfamille de protéines transmembranaires formant des hétérodimérisations non-covalentes entre une sous-unité intégrine α et une sous-unité β . Chez les mammifères, plus de 24 hétérodimères intégrines différents ont été caractérisés. Au total, 18 sous-unités α et de 9 sous-unités β différentes ont été identifiées. Les récepteurs intégrines agissent principalement comme agent de liaison entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire afin de réguler la transduction de différents signaux intracellulaires et la mise en place des complexes d'adhésion focaux.

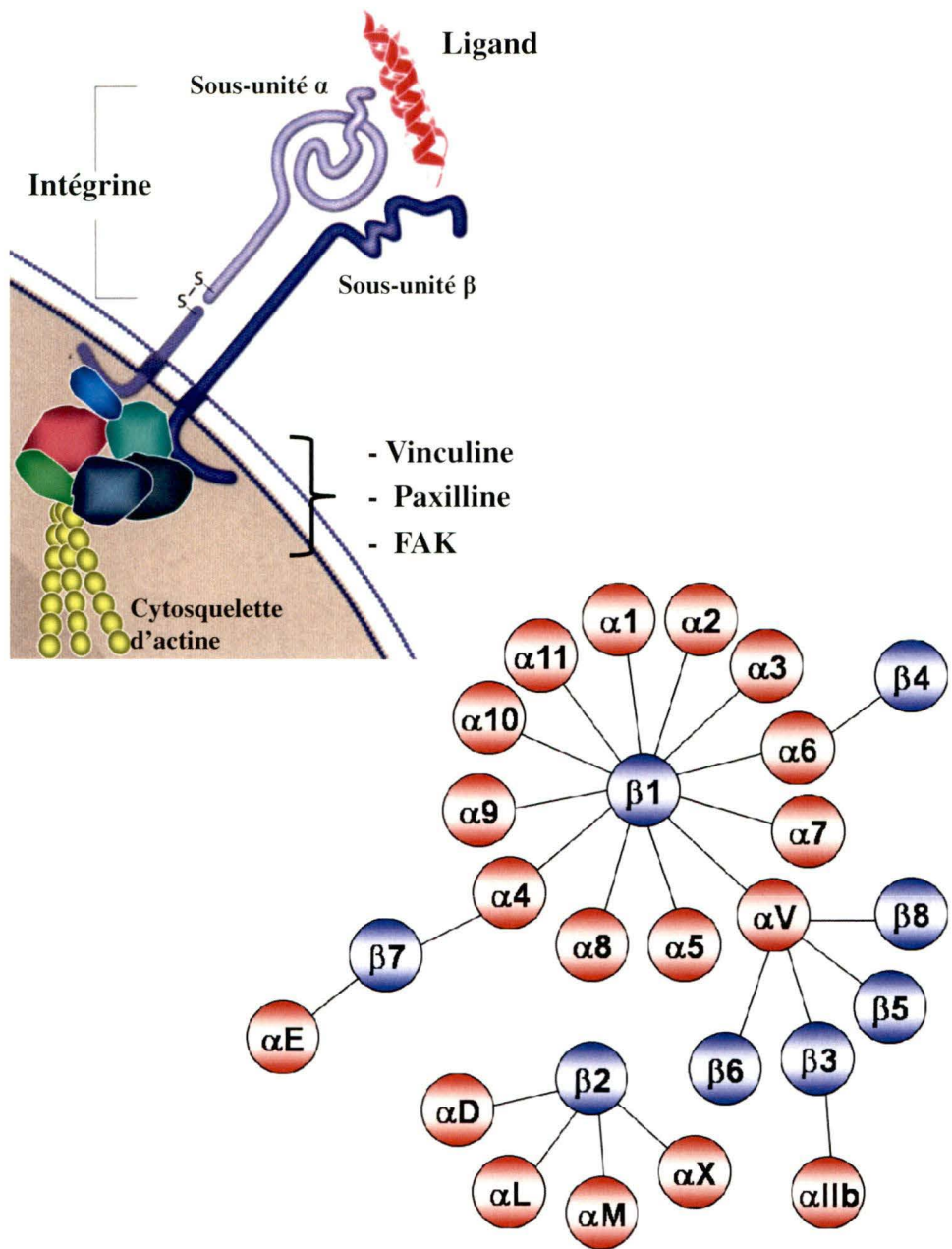


Figure-5: Les récepteurs intégrines

l'ostéopontine. Précisément, $\alpha 9\beta 1$ est reconnue pour être exprimée de manière transitoire au niveau de la crypte intestinale humaine (Desloges et al., 1998; Smith et al., 1996; Yokosaki et al., 1998). En plus d'être présente au niveau des cellules de la crypte intestinale en fonction de la présence du facteur de croissance EGF, l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ est souvent ré-exprimée au niveau de tumeurs du colon (Basora et al., 1997). Aussi, l'expression du récepteur majeur de la fibronectine, soit l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, ainsi que certaines intégrines αV ont été étroitement associées à la prolifération et la survie des cellules épithéliales intestinales (Beaulieu et al., 1992; Bouchard et al., 2008; Vachon et al., 1995; Zhang et al., 2003).

La survie cellulaire est un processus finement régulé et continuellement maintenu par l'action de cytokines, de facteurs de croissance et d'interactions avec la matrice extracellulaire. En ce sens, les récepteurs intégrines ont été démontrés comme ayant un rôle crucial dans la prévention de l'anoïkose ou mort cellulaire programmée suite au détachement de la cellule de son substrat (Reddig et Juliano, 2005). Au niveau des cellules épithéliales intestinales, il a été démontré que l'activation des intégrines constituées de la sous-unité $\beta 1$ est essentiel au maintien de la survie cellulaire à travers la signalisation par la *focal adhesion kinase* ou FAK (Bouchard et al., 2007; Bouchard et al., 2008). D'un point de vue plus détaillé, suite à l'activation des intégrines $\beta 1$, FAK qui est présente au niveau des points d'adhésion focaux, subit un changement de conformation entraînant son auto-phosphorylation sur le résidu tyrosine 397 (Y397). FAK ainsi activée, va transmettre un signal intracellulaire par le biais de la tyrosine kinase Src, qui va soutenir la survie cellulaire à travers l'activation des voies MEK/Erk et PI3-K/Akt

(Bouchard et al., 2007; Bouchard et al., 2008; Harnois et al., 2004). Une faille dans la transmission de ces signaux dits pro-survie entraîne le déclenchement de la cascade apoptotique, généralement caractérisée par la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale et l'activation des caspases (Grossmann et al., 1998; Harnois et al., 2004). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la survie des cellules épithéliales intestinales ont été démontrés comme étant dépendants de l'état de différenciation. D'une part, les entérocytes pleinement différenciés migrent de façon ascendante vers l'apex de la villosité où ils seront éliminés par anoïkose ou mort cellulaire par détachement du substratum. Dans la mesure moins fréquente, les cellules prolifératives et indifférenciées de la crypte peuvent entrer spontanément en apoptose/anoïkose afin d'éliminer les progéniteurs endommagés ou défectueux (Potten, 1997; Vachon et al., 2002). De plus, des études menées par l'équipe du Dr Vachon ont spécifiquement démontrées que la survie des cellules indifférenciées de la crypte dépend 1) de l'engagement des intégrines de type $\beta 1$ par la matrice extracellulaire, 2) de l'activation de la signalisation FAK/Src et 3) de la stimulation de la voie PI3-K/Akt (Bouchard et al., 2007; Bouchard et al., 2008).

1.9 L' intégrine $\alpha 8 \beta 1$

L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ a d'abord été identifiée au niveau du système nerveux du poulet avant la caractérisation de son orthologue humain (Bossy et al., 1991; Schnapp et al., 1995a; Schnapp et al., 1995b). Depuis ce temps, l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ est reconnue

pour être associée aux points d'adhésion focaux afin de participer à la régulation de phénomènes tels que l'adhésion, l'étalement, la croissance et la survie cellulaire au niveau du système nerveux ainsi que chez certaines cellules musculaires et mésenchymateuses (Bieritz et al., 2003; Farias et al., 2005; Levine et al., 2000; Muller et al., 1995; Schnapp et al., 1995b; Wagner et al., 2003; Zargham et Thibault, 2005; Zargham et al., 2007b). De plus, le groupe du Dr Thibault a établi le caractère essentiel de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ dans l'assemblage du cytosquelette d'actine ainsi que dans l'activation de la GTPase RhoA chez les cellules de muscles lisses vasculaires (Zargham et Thibault, 2006; Zargham et al., 2007a; Zargham et al., 2007b). Cependant, la présence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$, tout comme son implication dans un mécanisme analogue à celui existant chez les cellules de muscles lisses vasculaires, n'a jamais été décrit dans une structure épithéliale. L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ interagit avec ses différents ligands via la reconnaissance du motif peptidique RGD qui représente en fait une séquence spécifique des 3 acides aminés glycine, arginine et aspartate (Denda et al., 1998). Les deux ligands de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ étant les mieux décrits dans la littérature sont la fibronectine et la néphronectine (Brandenberger et al., 2001; Muller et al., 1995; Sato et al., 2009). Au niveau de l'intestin humain, la fibronectine (FN) est fortement déposée au niveau de la lame basale sous-jacente aux cellules cryptales et son expression serait grandement influencée par l'activation de l'*integrin-linked kinase* ou ILK (Beaulieu, 1997; Gagne et al., 2010). Pour sa part, la néphronectine (NPNT) constitue un élément glycoprotéique de la matrice extracellulaire dont les fonctions ont été principalement étudiées au niveau de

certaines tissus en développement tels que le rein et les os (Brandenberger et al., 2001; Kahai et al., 2010; Linton et al., 2007). Une dérégulation dans l'expression de la néphronectine a aussi été associée à des contextes pathologiques comme la nécrose tubulaire aigüe, les tumeurs mammaires et certains mélanomes (Cheng et al., 2008; Eckhardt et al., 2005; Kuphal et al., 2008). De plus il a été démontré que le motif RGD de la néphronectine avait une affinité pour l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ de 100 fois supérieure à celle de la fibronectine. Ainsi, la néphronectine représente un ligand préférentiel pour l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ par rapport à la fibronectine (Sato et al., 2009). L'interaction entre l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ et la néphronectine a été déterminée comme étant essentielle à une morphogenèse rénale adéquate (Linton et al., 2007). Considérant ces faits, il est clair que l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ présente chez certaines cellules mésenchymateuses, exerce un rôle critique dans la communication épithélium-mésenchyme par son interaction avec la néphronectine d'origine épithéliale.

1.10 Les cellules HIEC

Les cellules HIEC, ou «Human Intestinal Epithelial Crypt cells» ont été isolées par l'équipe du Dr Beaulieu, à partir d'un iléon foetal de 17 semaines, via l'utilisation d'une méthode de dissociation enzymatique de l'épithélium intestinal (Perreault et Beaulieu, 1996). Cette méthode ayant été initialement mise au point dans un contexte d'isolation de kératinocytes, permet une récolte optimale des

cellules épithéliales exemptes de cellules mésenchymateuses. Les premières caractérisations morphologiques des HIEC ont démontrées que celles-ci étaient comparables aux cellules indifférenciées de la crypte, tout comme leur équivalent chez le rat, soit les IEC-6. L'origine épithéliale des HIEC a été confirmée par leur expression des kératines 8, 18, 19 et 20/21 qui, dans un contexte intestinal, sont spécifiques à l'épithélium (Perreault et Beaulieu, 1996). De plus, il a été démontré que les HIEC ont conservé leur aptitude à exprimer le marqueur cryptal MIM-1/39 (Beaulieu et al., 1992). Surprenamment, les HIEC peuvent persister en culture cellulaire au-delà de 30 passages avant d'atteindre un état de sénescence. Quant à la présence de marqueurs de différenciation intestinaux chez les HIEC, la sucrase-isomaltase est absente tandis que de simples traces d'expression de DPPIV ont été décelées. L'ensemble de ces caractéristiques en font ainsi un modèle de cellules épithéliales normales de la crypte intestinale et non déterminées à se différencier. Les tentatives de mener les HIEC vers une différenciation et une polarisation marquée, en les ensemençant sur une matrice de laminine en présence de divers facteurs comme le TGF β n'ont pas porté fruit (Pageot et al., 2000). Cela suggère la présence potentielle de mécanismes répresseurs de l'expression de gènes cruciaux dans la détermination et le déclenchement de processus de différenciation intestinal. Finalement, la capacité de ce modèle cellulaire normal à persister en culture pour une longue période de temps, combiné au maintien de son état indifférencié, confère aux HIEC des propriétés semblables à celles des cellules souches intestinales.

1.11 Projet de recherche et hypothèses

Le but de mes travaux de doctorat est d'identifier et de comprendre les mécanismes moléculaires responsables du maintien de l'homéostasie cryptale au niveau de l'intestin grêle humain. Ceux-ci agissent tant au niveau du contrôle de la détermination et de la différenciation qu'au niveau de la croissance, de la motilité et de la survie cellulaire. Dans la réalisation de nos travaux en laboratoire, nous avons principalement eu recours au modèle cellulaire normal humain HIEC. Tel que mentionné plus tôt, ce modèle représente les cellules épithéliales indifférenciées des cryptes intestinales qui constituent le principal centre d'intérêt de mes travaux de recherche. Considérant la nature purement indifférenciée des cellules HIEC, nous avons d'abord tenté de pousser celles-ci vers l'initiation d'un processus de différenciation intestinal. Pour ce faire, nous avons intégré certaines informations de la littérature qui suggèrent que l'action concertée des facteurs de transcription Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 entraîne la transactivation d'une panoplie de gènes dont les produits sont spécifiques à un phénotype intestinal différencié. En ce sens, nous proposons que la surexpression ectopique de ces trois facteurs de transcription pro-différenciation puisse conduire une cellule cryptale indifférenciée à entreprendre un programme de différenciation intestinale. Ce processus devrait être caractérisé par 1) l'expression de certains marqueurs fonctionnels de différenciation, 2) la démonstration d'un certain degré de polarisation et 3) la présence de caractéristiques morphologiques propres aux cellules intestinales différenciées. À cet égard, l'impact de l'expression de ces

trois facteurs de transcription au niveau de la détermination de la cellule vers la voie absorbante ou la voie sécrétrice sera étudié. Considérant que les HIEC présentent une incapacité totale à se différencier en conditions normales de culture et que celles-ci ont la capacité de subsister au-delà de 30 passages, il est impératif de caractériser l'expression des nouveaux marqueurs des cellules souches et progénitrices de l'épithélium intestinal afin de mieux définir le statut de ce modèle cellulaire. Il sera tout aussi pertinent de porter une attention particulière aux mécanismes responsables du maintien des états pluripotent et prolifératif nouvellement identifiés chez certains types de cellules souches tel que les protéines du groupe polycomb. À ce niveau, notre hypothèse est que des complexes polycomb sont impliqués dans la répression de facteurs prédisposant une cellule à se différencier. Par ailleurs, il est clair que les interactions existantes entre une cellule et son microenvironnement se trouvent à la base des phénomènes régulateurs de diverses fonctions physiologiques fondamentales telles que l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie cellulaire. Dans cette optique, il est essentiel d'approfondir la caractérisation du patron d'expression des différents récepteurs intégrines au sein de l'axe crypte-villosité humaine en fonction de l'état de différenciation des cellules épithéliales. Des travaux réalisés auparavant dans notre laboratoire ont donné certains indices selon lesquels l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ pourrait être présente au niveau de la crypte intestinale et y jouer un rôle fonctionnel. Ainsi, la caractérisation du profil d'expression de la sous-unité $\alpha 8$ ainsi que l'abolition de son expression par ARN interférant nous

permettra de définir le rôle de ce récepteur n'ayant jamais été documenté au niveau des structures épithéliales.

II – Matériel et méthodes

2.1 Culture cellulaire

Les cellules normales de la crypte intestinales humaine HIEC ont été isolées à partir d'iléons fœtaux humains de 17 à 19 semaines de gestation selon la méthode décrite précédemment (Perreault et Beaulieu, 1996). Elles sont cultivées dans un milieu OptiMEM (Invitrogen) supplémenté de 1% de Glutamax et d'HEPES (GIBCO). À l'instar de certaines conditions expérimentales particulières, le milieu des HIEC contient 5% de sérum de veau fœtal et 5 ng/ml de EGF (BD Bioscience) (Perreault et Beaulieu, 1996). Sauf exception, les HIEC sont utilisées entre les passages 15 et 22. Les cellules cancéreuses de colon humain Caco-2/15, qui ont la capacité d'exécuter spontanément un programme de différenciation entérocytaire suite à l'atteinte de la confluence, ont été cultivées dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal tel que décrit précédemment (Quaroni et Beaulieu, 1997; Tremblay et al., 2006; Vachon et Beaulieu, 1992). Les cellules myofibroblastiques intestinales humaines HIM, utilisées comme contrôle mésenchymateux pour certaines expériences, ont été générées et cultivées tel que décrit précédemment (Seltana et al., 2010; Vachon et al., 1993) dans le même milieu OptiMEM que celui utilisé pour les HIEC. Les cellules épithéliales intestinales thermosensibles TsFHI arborent un phénotype

indifférencié et prolifératif lorsque qu'elles sont cultivées à 32°C. Toutefois, à 39°C elles se différencient et acquièrent une morphologie entérocytaire. C'est en fait la présence d'un antigène grand T thermosensible provenant du virus SV40 qui leur confère de telles propriétés (Pageot et al., 2000; Quaroni et Beaulieu, 1997). Les TsFHI ont été cultivées selon une méthode préétablie et déjà documentée (Quaroni et Beaulieu, 1997).

2.2 Traitement des spécimens tissulaires humains

Les échantillons tissulaires d'iléons proximaux adultes humains sains ont été obtenus avec la participation de Québec Transplant (Québec, Canada). Les tissus de jéjunum humains fœtaux ont été obtenus à partir de fœtus, âgés entre 14 et 20 semaines de gestation, suite à une interruption légale de la grossesse. Tous les travaux sont en accord avec les protocoles approuvés par le comité institutionnel de la recherche sur l'être humain de l'Université de Sherbrooke. Les techniques de préparation et d'inclusion des tissus en vue d'en générer des coupes cryogéniques ont été décrites précédemment (Beaulieu et al., 1992). Dans certains cas, la préparation de fractions épithéliales et mésenchymateuses pures a été effectué à l'aide d'une solution non-enzymatique contenant de l'EDTA (BD Bioscience) tel que documenté précédemment (Perreault et Beaulieu, 1998).

2.3 Conception des lignées HIEC inductibles et établissement des modèles de surexpression constitutives

L'établissement de populations stables de cellules HIEC, exprimant les formes humaines de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 de manière inductible, a été effectué via l'utilisation de vecteurs rétroviraux. D'abord, une population stable de HIEC comprenant le système d'expression génétique tetON a été obtenue par infections virales tel que décrit précédemment (Escaffit et al., 2006). Les vecteurs plasmidiques pRevTRE (BD Biosciences) contenant l'ADNc de chaque facteur de transcription, préalablement clonés par Dr Fabrice Escaffit tel que décrit précédemment (Escaffit et al., 2005a), ont été utilisés pour la production de virus à l'intérieur de la lignée 293T, suite à la co-transfection des vecteurs VPack-VSV-G helper (Stratagene). Le vecteur pRevTRE vide a été utilisé afin de produire le virus nécessaire à l'établissement des populations contrôles (indVide). Les cellules HIEC^{tetON} ont ensuite été infectées avec les différents virus générés puis sélectionnées avec 10 μ g/ml d'hygromycine (Invitrogen). Les lignées HIEC/indVide, HIEC/indCdx-2, HIEC/indHNF1 α et HIEC/indGATA-4 ont été utilisées en conditions non-induites (0 μ g/ml de doxycycline) ou induites (5 μ g/ml de doxycycline). La lignée stable double-inductible HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} a été générée en infectant des HIEC/indHNF1 α avec un rétrovirus contenant un gène de résistance à la puromycine ainsi que la séquence humaine de Cdx-2 en aval du système pRevTRE. La sélection a été effectuée avec 1 μ g/ml de puromycine et l'expression optimale de HNF1 α et de Cdx-2 a été obtenue en ajoutant 5 μ g/ml de

doxycycline au milieu de culture. Dans plusieurs expériences, les facteurs Cdx-2 et/ou GATA-4 sont exprimés de manière constitutive chez les cellules HIEC. Pour ce faire, des virus générés à l'aide du vecteur lentiviral pLPCX (BD Biosciences) contenant la séquence de ces facteurs ont été utilisés pour infecter les cellules HIEC. Le virus pLPCX vide a été utilisé comme contrôle d'infection. Les cellules HIEC appelées à se différencier ont été cultivées à post-confluence pendant 30 jours dans un milieu DMEM 5% sérum de veau fœtal sans EGF où l'induction à la doxycycline débute dès la confluence. Pour une expression optimale des marqueurs de différenciation entérocytaire, l'introduction de l'expression constitutive de GATA-4 s'est faite 5 jours post-induction à la doxycycline.

2.4 Établissement des lignées shRNA

Des populations stables démontrant une abolition de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ et de SUZ12, par l'entremise d'un shRNA, ont été établies par des infections lentivirales tel que décrit précédemment (Boudreau et al., 2007). Les oligonucléotides utilisés afin de générer le shRNA contrôle non-silencieux (shCNS)(5'-GATCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGAC-ACGTTTCGGAGAATTTTTTGGAAAC-3' et son complément 5'-TCGAGTTCC-AAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAAACGTGACACGTTTCG-GAGAAAC-3'), et le sh $\alpha 8$ (5'-GATCCGATCAGAGTTAATGGAACCTTCAA-

GAGAGGTTCCAT-TAACTCTGATCTTTTTTGGAAAC-3' et son complément
5'- CGAGTTCCAAAAAAGATCAGAGTTAATGGAACCTCTCTTGAAGG

TTCCATTAACTCTGATCG-3') ont été synthétisés par IDT (Coralville, IA). Les oligonucléotides appariés ont été sous-clonés dans le vecteur pLENTIU6. Pour sa part, le shSUZ12 a été élaboré et acheté chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Ce dernier se retrouve à l'intérieur du vecteur pLKO.1-puro. Les populations de HIEC et Caco-2/15 sous-confluentes infectées ont été sélectionnées pendant 10 jours avec 5 µg/ml de blasticidine (shCNS et shα8) ou 1 µg/ml de puromycine (shSUZ12).

2.5 Extraction protéique

Suite à l'élimination du milieu de culture, les monocouches de cellules sont lavées à l'aide d'une solution tampon phosphate physiologique ou PBS (140 mM de NaCl (Fisher), 3 mM de KCl (Fisher), 8 mM de Na₂HPO₄ (J.T. Baker) et 1,5 mM de KH₂PO₄ (J.T. Baker)) puis solubilisées dans un tampon Laemli (Tris-HCL 1M, SDS 5%, Glycérol 20%, Bleu de bromophénol 2%) contenant 5% de β-mercaptoéthanol (Bio-Rad). L'extrait est ensuite soumis à 10 pulsations de sonicateur, centrifugé à 15 000 rpm pendant 5 minutes puis chauffé à 95°C pendant 5 minutes avant d'être quantifié par un essai colorimétrique selon la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951; Noble et Bailey, 2009). Bien que cette méthode de quantification des protéines soit sensible à la présence de β-

mercaptoéthanol contenu dans le tampon Laemli, nous avons contourné ce problème en précipitant d'abord 10 µl de chaque extrait dans de l'acide trichloroacétique 20%. Suite à une étape de centrifugation (10 minutes à 13 000 rpm), les culots sont resuspendus dans du NaOH 0,1 N.

Pour la préparation d'extraits protéiques membranaires, les cellules HIEC ont d'abord été incubées à 0°C dans un tampon de lyse contenant 250 mM de sucrose (Sigma), 10 mM de Tris pH 7.5 (Wisent), 1 mM de PMSF (Fluka) et 1% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma). Après 3 cycles de congélation à l'azote liquide suivi d'une décongélation à 37°C, les échantillons ont été centrifugés à 100 000 x g, à 4°C pendant 1 heure. Les culots obtenus ont été lavés avec du tampon de lyse puis re-suspendus dans 100 µl de tampon de lyse contenant 0,1% de SDS et 1% de Triton-X100.

Tous les extraits protéiques sont conservés à -20°C avant d'être chargés sur gel de polyacrylamide en vue d'un immunobuvardage.

2.6 Extraction d'ARN et génération des échantillons d'ADNc

L'ARN total provenant de cellules en culture ou de fractions tissulaires est extrait selon la méthode TriPure (Roche, Laval, Qc) et conservée à -80°C. L'intégrité de l'ARN total de chacun des échantillons est validée par une analyse visuelle des formes 28S et 18S sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium.

Étant donné l'hypersensibilité de la réaction de transcriptase inverse face à la variation des concentrations de sels et la présence de divers contaminants, les extraits d'ARN provenant de fractions tissulaires sont re-purifiés via l'utilisation de colonnes RNeasy (Qiagen). Les extraits d'ARN totaux sont ensuite quantifiés par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance de la solution à 260 nm. La qualité des extractions est aussi vérifiée en établissant le ratio de l'absorbance à 260 nm par rapport à l'absorbance à 280 nm où une valeur située entre 1,6 et 1,8 correspond à un extrait pur. La synthèse des échantillons d'ADNc est ensuite effectuée à partir de 2 µg d'ARN total, via l'utilisation de l'enzyme Omniscript reverse transcriptase (Qiagen) en présence d'oligo(dT) à titre d'amorce (Amersham Pharmacia Biotech) tel que décrit précédemment (Ni et al., 2005).

2.7 Réaction de polymérase en chaîne (PCR) et PCR quantitatif

Dans le cas des réactions de PCR standard, une quantité équivalente des divers échantillons d'ADNc testés est ajoutée à un mélange réactionnel contenant 2,5 µl d'un tampon d'amplification 10X (Qiagen), 10 µM de chacune des deux amorces spécifiques (IDT), 200 µM d'une solution de dNTP (New England Biolabs), et 1 µl d'enzyme *Taq* polymérase (New England Biolabs). Le volume total de chaque tube réactionnel est complété à 25 µl avec de l'eau nanopure. Les tubes contenant chaque mélange réactionnel sont soumis à 30 cycles d'amplification composés d'une période de dénaturation à 94°C de 45 secondes, une période d'appariement

des amorces à 60°C pour une durée de 45 secondes et d'une phase d'élongation de 1 minute à 72°C, à l'intérieur d'un appareil iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad).

Dans le cas des réactions de PCR quantitatif, chaque tube contient 10 µl du mélange réactionnel commercial 2X Brilliant® II (Stratagene), 10 µM de chacune des deux amorces spécifiques et le volume total de chaque tube est complété à 19 µl avec de l'eau nanopure. Finalement, 1 µl d'échantillon d'ADNc est ajouté à chaque réaction. Les tubes sont ensuite placés dans un appareil thermocycleur Mx3000P (Stratagene) exécutant d'abord une période d'activation de la *Taq* polymérase à 95°C, suivit de 40 cycles d'amplification comprenant une période de dénaturation à 95°C de 30 secondes, une période d'appariement des amorces à 55°C pour une durée de 30 secondes et d'une phase d'élongation de 1 minute à 72°C. Les lectures de fluorescence ont été acquises par l'appareil après chaque phase d'appariement. Finalement, l'appareil fait l'acquisition de données portées en courbe de dissociation des produits de réaction afin de valider la spécificité de la réaction de PCR. L'efficacité des réactions de PCR quantitatif se situent entre 90% et 110% et ont été déterminées à l'aide de courbes standard.

Les détails relatifs à chacune des paires d'amorces utilisées pour les réactions de PCR standard et quantitatif sont présentés dans le Tableau-1.

Tableau-1: Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR standard et PCR quantitatifs

Gène	Amorce «sens»	Amorce «anti-sens»
RPLP0	5'-GCAATGTTGCCAGTGTCTG-3'	5'-GCCTTGACCTTTTCAGCAA-3'
Cdx-2	5'-ACGTGAGCTACCTCCTGGAC-3'	5'-CAGGGACAGAGCCAGACACT-3'
HNF1 α	5'-GCAGCCGAGCCATGGTTTCT-3'	5'-CCCCCAAGCAGGCAGTA-3'
B-actine	5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'	5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'
Sucrase-isomaltase	5'-GAGGACACTGGCTTGGAGAC-3'	5'-ATCCAGCGGGTACAGAGATG-3'
DPPIV	5'-CCTTCTACTCTGATGAGTCACTGC-3'	5'-GTGCCACTAAGCAGTTCATCTTC-3'
Li-cadhérine	5'-GAGTGAGAATTCCTTCAGTG-3'	5'-GTCCATCCATGGGAAGTTTGG-3'
E-cadhérine	5'-TTGCAAATTCCTG CCATTC-3'	5'-GCTGGCTCAAGTCAAAGTCC-3'
Zonula-occludens-2	5'-GGGATATTGCAGGCACAGTT-3'	5'-CGCTGTCTCCCTTCTTGAAC-3'
Cinguline	5'-GCTCCTGTTAGCTCGTGGTCC-3'	5'-GAAAAGGCTCAGTTGGCTTG-3'
Villine-2	5'-GGCTGCAGGACTATGAGGAG-3'	5'-TGGCAGTGTATTCTGCAAGC-3'
Claudine-11	5'-CTGGTGGACATCCTCATCCT-3'	5'-CCAGCAGAATGAGCAAAACA-3'
Calbindine-2	5'-GCTCCAGGAATACACCCAAA-3'	5'-CAGCTCATGCTCGTCAATGT-3'
Bmi-1	5'-TGTTTCGTTACCTGGAGACC-3'	5'-CAGCATCAGCAGAAGGATG-3'
DcamKL1	5'-GGGCAGCAGGTGTAATCACT-3'	5'-TTAACCCAGGGATGCTCAAG-3'
Musashi-1	5'-TACGCCAGCCGGAGTTATAC-3'	5'-ATTGGTCCGTAGGCAGTGAG-3'
Lgr5	5'-TGCTCTTCACCAACTGCATC-3'	5'-CTCAGGCTCACCAGATCCTC-3'
P16 ^{INK4a}	5'-ATATGCCTTCCCCACTACC-3'	5'-GCCATTTGCTAGCAGTGTGA-3'
Intégrine α 8	5'-CAGTTTGGACGAATCCACCT-3'	5'-TGCTGTCT-GGATTGTCCTTG-3'
Vimentine	5'-AGATGGCCCTTGACATTGAG-3'	5'-GGTCATCGTGATGCTGAGAA-3'
Hath-1	5'-CCGCCCAGTATTTGCTACAT-3'	5'-CATTCACCTGTTTGCTGGAA-3'
Hes-1	5'-AGTCTACGATGGGACCGAGA-3'	5'-GTTGGCCAGGTCTGTGATT-3'

2.8 Immunobuvardage

Des quantités équivalentes d'extraits protéiques sont chargées puis séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide dont la concentration varie entre 10 et 15% selon la taille de la protéine d'intérêt. Les détails de cette étape ont été documentés précédemment (Benoit et al., 2009; Perreault et Beaulieu, 1996). Par la suite, les protéines séparées par le gel de polyacrylamide sont transférées, sous l'influence d'un courant électrique, sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Les sites non-occupés par les protéines préalablement transférées sont bloqués en incubant la membrane pendant 2 heures, dans une solution contenant 5% de lait en poudre sans lipide (Nestlé) et 0,1% de TWEEN-20 (Bio-Rad) dans du tampon PBS, sous agitation constante et à la température de la pièce. L'incubation des anticorps primaires, dilués adéquatement dans la solution de blocage, est effectuée à 4°C sur une période de 12 à 18 heures. Les différentes dilutions utilisées et les principales caractéristiques pour chaque anticorps primaire sont présentées dans le Tableau-2. Par la suite, les membranes sont lavées 5 fois pendant 10 minutes dans du PBS contenant 0,1% de TWEEN-20 puis incubées, pendant une heure à la température de la pièce, en présence d'un anticorps secondaire conjugué à l'enzyme HRP et spécifiquement dirigé contre l'espèce de provenance de l'anticorps primaire étudié. Les anticorps anti-souris et anti-lapin (Amersham) sont dilués 1 :5000 dans la solution de blocage tandis que l'anti-chèvre (Santa Cruz Biotech) et l'anti-rat (Amersham) sont utilisés à 1 :3000 et 1 :10000 respectivement. Suite à 5 autres lavages de 10 minutes dans du PBS

TWEEN-20 0,1%, la présence de l'anticorps secondaire couplé à la HRP est révélée par une réaction de bioluminescence engendrée par l'utilisation des réactifs Immobilon Western® (Millipore).

Tableau-2: Description des anticorps utilisés en immunobuvardage

Anticorps/Source	Détails/Fournisseur	Dilution
Anti-HNF1 α (Chèvre)	Santa Cruz Biotech	1 :500
Anti-Cdx-2 (Souris)	88/Biogenex	1 :500
Cytokératine-18 (Souris)	CY-90/Sigma	1 :10000
Anti-Cycline D (Lapin)	Santa Cruz Biotech	1 :5000
Anti-p27 ^{KIP1} (Lapin)	Santa Cruz Biotech	1 :2000
Anti-GATA-4 (Chèvre)	Santa Cruz Biotech	1 :500
Anti-E-Cadhérine (Souris)	BD Transduction lab	1 :2000
Anti-SUZ12 (Lapin)	D39F6/Cell Signaling	1 :1000
Anti-Actine (Souris)	C4/Chemicon	1 :80000
Anti-H3K27me3 (Lapin)	Millipore	1 :2000
Anti- α 8 (Lapin)	A8-2/Dr G. Thibault	1 :3000
Anti- α V (Lapin)	AV1/Chemicon	1 :1000
Anti- β 1 (Rat)	mAb13/Dr K.M. Yamada	1 :1000
Anti-Vinculine (Souris)	7F9/Chemicon	1 :10000
Anti-RhoA (Souris)	Santa Cruz biotech	1 :200
Anti-PARP (Lapin)	9542/Cell Signaling	1 :1000
Anti-Sucrase-Isomaltase (souris)	HSI-14/Dr JF Beaulieu	1 :10
Anti-phospho-FAK (Lapin)	44-624/Biosource	1 :1000

Anti-FAK (Souris)	F15020/L7/BD Trans Lab	1 :1000
Anti-phospho-Akt (Lapin)	Cell Signaling	1 :1000
Anti-Akt (Lapin)	Cell Signaling	1 :1000

2.9 Immunofluorescence

La procédure de détection de protéines d'intérêt par immunofluorescence employée a été préalablement décrite (Beaulieu et al., 1992). Brièvement, les coupes cryogéniques de 3µm d'épaisseur sont fixées dans du paraformaldéhyde 2% (Sigma) pendant 45 minutes à la température de la pièce. Trois lavages au PBS pendant 5 minutes chacun sont effectués. Par la suite, une neutralisation des composés aldéhydes est effectuée par l'incubation des tissus dans une solution de PBS-glycine 100 mM à pH 7.4 pendant 45 minutes à 4°C. Encore une fois, trois lavages au PBS de 5 minutes suivent cette étape. Ensuite, les sites d'interactions protéiques non-spécifiques sont ensuite bloqués par l'incubation des tissus dans une solution de PBS-BSA 2%, pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les anticorps primaires dirigés spécifiquement contre les protéines d'intérêt sont dilués dans la solution de blocage puis incubés avec les tissus pendant une période de 12 à 18 heures à 4°C. Les différentes dilutions utilisées et les principales caractéristiques pour chaque anticorps primaire sont présentées dans le Tableau-3. Suivant trois lavages successifs au PBS pendant 5 minutes, les tissus sont ensuite incubés en présence des anticorps secondaires spécifiques à l'espèce de provenance des anticorps primaires préalablement utilisés. Les anticorps anti-

souris, anti-lapin et anti-chèvre couplés à différents fluorophores (ALEXA Fluor®, rouge-594 et vert-488, Invitrogen) sont dilués 1 :200 dans la solution de blocage. Les tissus sont ensuite lavés 2 fois pendant 5 minutes, incubés avec une solution de PBS-DAPI (1 :10 000) (Sigma) pendant 3 minutes, puis lavés à nouveau dans du PBS pendant 5 minutes. Une goutte de milieu de montage (glycérol :PBS 9:1 + 0,1% de paraphénylenediamine) est déposé sur chaque tissus puis une lamelle de verre vient recouvrir le tout avant de procéder aux observations microscopiques à l'aide d'un appareil Leica Reichart Polyvar 2 (Leica) équipé d'une caméra couleur digitale Leica DFC300 FX.

Dans le cas des expériences d'immunofluorescences pratiquées sur des cellules, celles-ci sont préalablement ensemencées, sur des lamelles de verre enduites de collagène de type I ou de sérum de veau fœtal, 24 heures avant leur fixation. Dans certains cas, ces cellules sont aussi incubées en présence de 20 μ M de l'inhibiteur spécifique de la kinase ROCK Y-27632 (Sigma) suite à leur ensemencement sur lamelle. Suivant la fixation, les cellules ont aussi été perméabilisées par une incubation de 3 minutes avec du PBS-Triton-X100 0,2%. De plus, les fibres de stress d'actine ont été mises en évidence via l'incubation des cellules, pendant une heure à la température de la pièce, avec de la phalloïdine couplée à la rhodamine (FAK100, Millipore) diluée 1 :5000 dans la solution de blocage. Pour la co-immunolocalisation de la vinculine et de la paxilline, une étape supplémentaire de blocage avec des IgG de souris ainsi qu'une post-fixation au paraformaldéhyde 2%, suivant l'incubation de l'anti-souris (ALEXA Fluor®, vert-488, Invitrogen) dirigé contre l'anti-vinculine, a été nécessaire afin d'empêcher la réaction croisée

de l'anti-souris avec l'anti-paxilline couplé à la rhodamine. Les complexes d'adhésion focaux marqués par la présence de vinculine et/ou de paxilline ont été comptés via l'utilisation du logiciel MetaMorph Imaging System® (Universal Imaging Corp. West Chester, PA).

Tableau-3: Description des anticorps utilisés en immunofluorescence

Anticorps/Source	Détails/Fournisseur	Dilution
Anti-HNF1 α (Chèvre)	Santa Cruz Biotech	1 :200
Anti-Cdx-2 (Souris)	88/Biogenex	1 :200
Anti-GATA-4 (Chèvre)	Santa Cruz Biotech	1 :200
Anti-Bmi-1 (Lapin)	Cell Signaling	1 :200
Anti-SUZ12 (Lapin)	D39F6/Cell Signaling	1 :2000
Anti-Sucrase-Isomaltase (Souris)	HSI-5/Dr JF Beaulieu	1 :500
Anti-PLA2G2A (Lapin)	Santa Cruz Biotech	1 :5000
Anti- α 8 (lapin)	Dr L.M. Schnapp	1 :500
Anti-Vinculine (Souris)	Chemicon	1 :1000
Anti-Paxilline-TRITC (Souris)	BD Transduction Lab	1 :500

2.10 Génération des peptides GST-TNfn3

Les séquences d'ADNc encodant le fragment de la tenascine-C recombinant, qui contiennent la 3^e répétition fibronectine de type III et le motif RGD intact (TNfn3 RGD) et le motif muté (TNfn3 RAA), ont été générés puis clonés selon la procédure employé par Yokosaki et ses collaborateurs (Yokosaki et al., 1998). Les vecteurs plasmidiques pGEX contenant les séquences GST-TNfn3 RGD et GST-TNfn3 RAA ont été utilisés pour la transformation de bactéries *E. coli* compétentes et la production des peptides recombinants a été induite par l'ajout d'IPTG aux bouillons de culture. Ces peptides ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité sur colonnes (Poly-Prep® Chromatography Columns, Bio-Rad) contenant des billes de sépharose Sephadex G-25 couplées à la glutathionne (Pharmacia). L'élution des colonnes a été effectuée avec une solution contenant la forme réduite de la glutathionne (ICN Biochemicals).

2.11 Essais d'adhésion cellulaire

Les cellules HIEC adhérentes sont d'abord récoltées en utilisant une solution de PBS-EDTA 0,5 mM. Les cellules sont incubées en présence de cette solution pendant 10 minutes à 37°C puis ensuite centrifugées à 100 x g pendant 5 minutes à 4°C avant d'être re-suspendues dans du milieu OptiMEM' contenant 0,2% de

sérum de veau foetal et 0,3 mM de MnCl_2 (Sigma). Pour les essais d'adhésion faits sur une période de 24 heures, 10 $\mu\text{g/ml}$ de cycloheximide ont été ajoutés aux milieux de culture afin d'éviter la production d'éléments de la matrice extracellulaire endogènes (Vainionpaa et al., 2006). Cependant, pour les essais d'adhésion faits sur 1 heure, la présence de cycloheximide n'est pas nécessaire puisque sur cette courte période de temps la production de matrice endogène est jugée comme étant négligeable. Pour ces mêmes essais d'adhésion sur 1 heure, des anticorps bloquants ont été incubés en présence des cellules re-suspendues pendant 30 minutes à 37°C. Les différentes concentrations des anticorps bloquants utilisés ainsi que leurs principales caractéristiques sont décrites dans le Tableau-4. Des plaques de 48 puits (Falcon) sont enduites des peptides d'adhésion appropriés (40 $\mu\text{g/ml}$ des peptides GST, GST-TNfn3 RGD et GST-TNfn3 RAA dans du PBS) et les sites d'interactions protéiques non-spécifiques sont bloqués à l'aide d'une solution de BSA 2%. 50 000 cellules ont étéensemencées dans chaque puits et incubées 1 heure, pour les essais faits sur une courte période de temps avec utilisation des anticorps bloquants, puis pendant 24 heures pour les essais impliquant les cellules contenant un shRNA. Les cellules non-adhérentes sont éliminées par une succession de lavages au PBS et les cellules restantes sont fixées avec du PFA 2% pendant 1 heure à 4°C. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution de PBS-Triton-X100 0,2% et les noyaux de ces cellules sont colorés au DAPI avant d'être comptés manuellement pour chaque condition expérimentale.

Tableau-4: Description des anticorps neutralisants utilisés en essais d'adhésion cellulaire

Anticorps	Détails/Fournisseur	Utilisation
Anti- β 1	mAb-13, Dr K.M. Yamada	10 μ g/ml
Anti- α 5	mAb-15, Dr K.M. Yamada	25 μ g/ml
Anti- α 9	Y9A2, Dr D. Sheppard	10 μ g/ml
Anti- α V	mAb2021Z, Chemicon	25 μ g/ml
Anti- α V β 3	LM609, Biogenesis	10 μ g/ml
Anti- α V β 5	P1F6, GIBCO	5 μ g/ml

2.12 Essais de migration cellulaire par induction de blessures

Les cellules HIEC ont étéensemencées dans des boîtes de pétris de 100 mm² (Falcon) et cultivées jusqu'à 2 jours post-confluence. Des blessures dans les monocouches de cellules sont ensuite induites à l'aide de grattoirs à cellules de 19 mm (Costar, Corning, NY). Les monocouches de HIEC blessées sont incubées pendant 48 heures dans du milieu OptiMEM contenant 2 mM d'hydroxyurée (Sigma) afin de bloquer toute contribution de la prolifération cellulaire (Tetreault et al., 2008). Par la suite, les cellules sont fixées avec du paraformaldhéyde 2% et les noyaux sont colorés avec du DAPI 1:10 000 pendant 3 minutes. Finalement, les cellules ayant migré au-delà du front de la blessure sont dénombrées manuellement.

2.13 Culture de cellules en suspension

Les cellules HIEC adhérentes sont d'abord privées en sérum pendant 24 heures puis récoltées en utilisant une solution de PBS-EDTA 0,5 mM. Les cellules sont incubées en présence de cette solution pendant 10 minutes à 37°C puis ensuite centrifugées à 100 x g pendant 5 minutes à 4°C avant d'être re-suspendues dans du milieu OptiMEM sans sérum contenant 0,3 mM de MnCl_2 (Sigma). Une incubation en présence d'un anticorps neutralisant la sous-unité intégrine αV à une concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ (mAb2010Z, Chemicon) est effectuée pendant 30 minutes à 37°C. 500 000 cellules sont ensuiteensemencées dans des boîtes de pétris de 60 mm^2 (Falcon) enduites de BSA afin de prévenir toutes formes d'adhésion cellulaire. Le peptide RGD soluble (Sigma) est ajouté au milieu de culture selon une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ afin d'activer l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ à la surface des cellules. Aussi, 10 $\mu\text{g/ml}$ de cycloheximide sont ajoutés aux milieux de culture afin d'éviter la production d'éléments de la matrice extracellulaire endogènes (Vainionpää et al., 2006). Afin de renverser le phénomène anti-apoptotique engendré par la perte de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ chez les HIEC en suspension, 30 μM de l'inhibiteur pharmacologique de la PI3-K, soit le LY-294002 (Sigma) ont été ajouté à certaines expériences. Après l'incubation des cellules en suspension pour une période de 18 heures à 37°C, celles-ci sont récoltées et utilisées pour des essais d'immunobuvardage ou de cytométrie de flux.

2.14 Essais de pull-down rhotekine

Les essais de détection et de quantification de la forme active de RhoA (RhoA-GTP) ont été effectués à l'aide du «Rho Activation Assay Biochem Kit» (Cytoskeleton) selon le protocole fourni par le manufacturier. Brièvement, des billes recouvertes de glutathionne sont couplées à une protéine de fusion comprenant une portion GST ainsi que les acides aminés 7 à 89 de la rhotekine. Cette portion de la rhotekine est reconnue pour être spécifiquement liée par la forme active de RhoA. Ainsi, des lysats de HIEC sont incubés en présence de ces billes puis ces dernières sont ensuite isolées par centrifugation, lavées puis re-suspendues dans un tampon Laemli contenant 5% de β -mercaptoéthanol avant d'être chargées sur gel de polyacrylamide en vue d'un immunobuvardage.

2.15 Courbes de prolifération

Les populations stables de HIEC inductibles pour l'expression de GATA-4 ont été ensemencées dans des boîtes de pétris de 35 mm² (Falcon), selon une densité de départ de 200 000 cellules par boîte, dans du milieu OptiMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal. À différents jours 2, 4, 6, 10, 12, 14 et 16 post-ensemencement, 3 boîtes de chaque lignée sont récoltées et le nombre de cellules

s'y trouvant est compté en utilisant un appareil compteur de particule Z1 Coulter Counter (Beckman).

2.16 Essais d'incorporation de BrdU

Chaque type cellulaire étudié est d'abord ensemencé selon une concentration de 100 000 cellules par puits dans une plaque de 24 puits (Falcon) contenant des lamelles de verre prétraitées au sérum de veau fœtal. Les cellules sont ensuite cultivées dans du milieu OptiMEM 5% sérum + EGF pendant 24 heures. Pour certaines expériences, de la doxycycline (pour les lignées inductibles) ou l'inhibiteur Y-27632 sont ajoutés aux milieux de culture pendant cette période. Une dilution 1:1000 de «In Situ Cell Proliferation Kit Fluos® – BrdU labelling reagent» (Roche) dans du OptiMEM 5% sérum + EGF est ensuite ajoutée aux cellules pour une incubation de 4 heures à 37°C. Au terme de cette étape, les cellules sont lavées au PBS, fixées au méthanol 10 minutes à -20°C, puis incubées en présence d'une solution de Xagor (HCL 4N) pendant 8 minutes à la température de la pièce afin de dénaturer la chromatine et favoriser l'exposition du BrdU en vue d'une immunodétection. Trois lavages successifs de 5 minutes avec du PBS sont effectués afin de tamponner le pH et le blocage des sites d'interactions protéiques non-spécifiques est réalisé à l'aide du «In Situ Cell Proliferation Kit Fluos® – Blocking reagent» (Roche) (10 minutes, température de la pièce). Les cellules sont ensuite incubées, à 37°C pendant 45 minutes, avec

une dilution 1:50 dans du PBS d'un anticorps anti-BrdU couplé au FITC fourni dans le «In Situ Cell Proliferation Kit Fluos®» (Roche). Les cellules sont finalement lavées au PBS, leurs noyaux sont colorés avec du DAPI 1:10 000, puis les cellules BrdU-positives sont dénombrées manuellement lors d'observations microscopiques faites à l'aide d'un appareil Leica Reichart Polyvar 2 (Leica) équipé d'une caméra couleur digitale Leica DFC300 FX.

2.17 Cytométrie par balayage laser en condition adhérentes

Chaque lignée cellulaire est d'abordensemencée dans une plaque 12 puits (Falcon) selon une densité de 500 000 cellules par puits et gardées en culture pour une période de 48 heures. Pour certaines expériences, de la doxycycline est ajoutée aux cellules à cette étape. Les cellules sont fixées au méthanol, 10 minutes à -20°C, puis les noyaux sont colorés avec du DAPI 1:1000 pendant 1 heure. Chaque puits est ensuite soumis à un balayage laser à l'aide d'un appareil iCys Imaging Cytometer (Compucyte, Cambridge, MA) afin de mesurer le contenu en ADN de chaque cellule. Au total, 3000 cellules isolées sont analysées puis sont réparties en 3 groupes distincts, soit G1, S et G2/M, en fonction de leur contenu en ADN et de leur morphologie nucléaire (Darzynkiewicz et al., 2001).

2.18 Cytométrie de flux

Suite aux essais de culture cellulaire en suspension, nous avons évalué les niveaux de mort cellulaire chez les cellules HIEC/shCNS et HIEC/shα8 selon leur perméabilité à l'iodure de propidium (Darzynkiewicz et al., 1992). Bièvement, les cellules sont centrifugées à 100 x g pendant 5 minutes à 4°C, puis re-suspendues dans du PBS à 0°C contenant 1 µg/ml d'iodure de propidium. L'analyse de 10 000 cellules provenant de chaque expérience est effectuée par un appareil FACScan flow cytometer (BD Bioscience) et les données sont analysées par le logiciel CellQuest (BD Bioscience).

2.19 Microscopie électronique

La préparation d'échantillons cellulaires en vue d'analyses ultrastructurales a été effectué tel que décrit précédemment (Perreault et Beaulieu, 1998; Quaroni et Beaulieu, 1997; Vachon et Beaulieu, 1992). Brièvement, les cellules HIEC inductibles, avec ou sans infection lentivirale subséquente, ont été cultivées pendant 30 jours post-confluence en présence de 5 µg/ml de doxycycline. Les monocouches de cellules sont ensuite lavées avec un tampon 0,1 M de cacodylate de sodium (pH 7.4) puis fixées au glutaraldéhyde 2,5% pendant 1 heure à la température de la pièce. Par la suite, les cellules sont post-fixées dans une solution

de tétrahydroxyde d'osmium 2% puis déshydratées dans une étuve. Les échantillons devant être analysés en microscopie électronique à transmission sont inclus dans une résine de type EPON-araldite. Des coupes ultra-minces des cellules dans l'araldite sont finalement analysées avec un microscope électronique à transmission de type Hitachi 7500. Pour leur part, les échantillons devant être analysés en microscopie électronique à balayage sont déshydratés puis leur surface est recouverte de microparticules d'or. Les analyses sont faites à 15 kV à l'aide d'un appareil JEOL JSM 840.

2.20 Analyses par micropuces à ADN

L'ARNm des extraits d'ARN total des différentes lignées HIEC a d'abord été amplifié avec le «TargetAMP 1-round Amplification Kit®» (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) selon les instructions du manufacturier. De plus, la préparation des sondes et la procédure d'hybridation de celles-ci ont été faites tel que décrit précédemment (Tremblay et al., 2006). Les micropuces à ADN (SS-H19k8), présentant 19 200 clones d'ADNc humains, ont été obtenues du «University Health Network of Toronto» (Ontario, Canada). Un total de 4 expériences indépendantes a été fait sur des échantillons de HIEC^{indHNF1α/Cdx-2} + vecteur vide et de HIEC^{indHNF1α/Cdx-2} + GATA-4 en fonction du contrôle HIEC/indVide. Deux expériences indépendantes ont été réalisées sur les échantillons de HIEC^{indHNF1α/Cdx-2} + shSUZ12 et HIEC^{indHNF1α/Cdx-2} + shCNS.

L'analyse des données a été effectuée tel que décrit par Tremblay & al (Tremblay et al., 2006) et des analyses d'ontologie génétique et de classification fonctionnelle ont été effectuées via l'utilisation des outils bioinformatiques «Database for Annotation», «Visualization and Integrated Discovery (DAVID)» et «Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)».

2.21 Analyses statistiques

Toutes les données présentées sont exprimées sous forme d'une moyenne de toutes les expériences +/- l'erreur standard moyen. Chaque procédure expérimentale a été répétée au moins 3 fois, sauf en ce qui concerne les figures 11 et 16 (résultats préliminaires : $n = 2$) et les résultats représentatifs de ces expériences ont été montrés. Les données relatives aux analyses par micropuces à ADN ont été soumises à un test Anova tel que décrit précédemment (Tremblay et al., 2006). Les données se rapportant aux expériences d'incorporation de BrdU et aux essais d'adhésion ont été traitées selon le modèle linéaire mixte. Toutes les autres valeurs ont été soumises à un test de Student bilatéral. Dans chaque cas, une valeur de «P» supérieure ou égale à 0,05 a été considérée comme étant significative.

III – Résultats

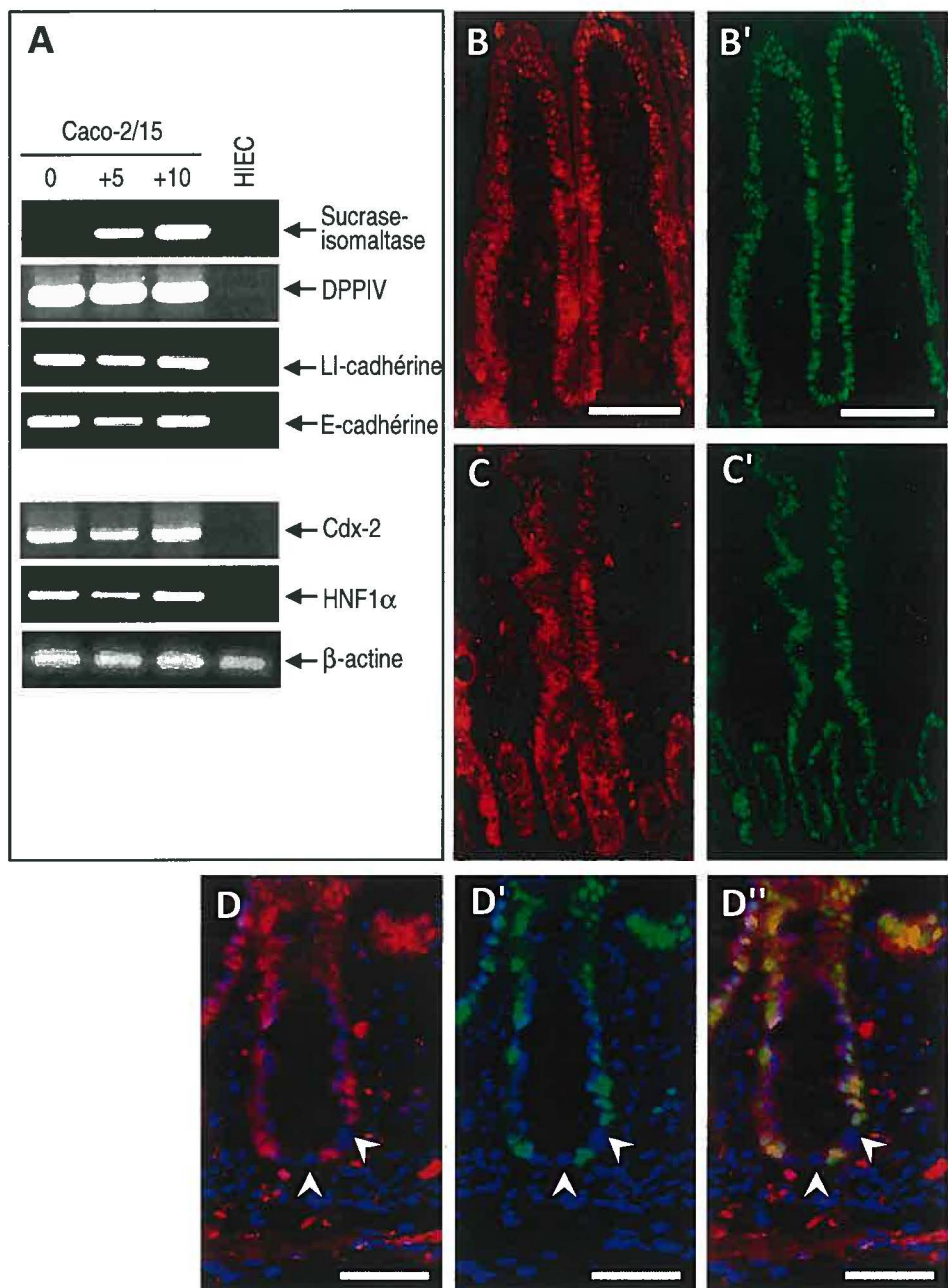
3.1 Détermination du patron d'expression des facteurs Cdx-2 et HNF1α au niveau de la muqueuse intestinale humaine

Tel que discuté précédemment, les cellules HIEC démontrent certaines propriétés associées aux cellules épithéliales intestinales comme l'expression des kératines 18 et 20 ainsi que le marqueur des cellules cryptales MIM-1/39. Toutefois, les cellules HIEC ne démontrent aucun signe de polarisation ou de différenciation intestinale (Escaffit et al., 2005b; Pageot et al., 2000; Perreault et Beaulieu, 1996). D'un point de vue morphologique, les HIEC présentent une surface plane, des complexes de jonctions peu organisés et de très faibles niveaux d'expression des différents marqueurs de différenciation. De telles observations confirment ainsi leur statut de cellules cryptales (Pageot et al., 2000). Pour leur part, les cellules Caco-2/15 constituent un modèle cellulaire intestinal qui origine d'un carcinome de colon humain et qui a été largement caractérisé dans la littérature. Lorsqu'elles sont cultivées à sous-confluence, les cellules Caco-2/15 démontrent des propriétés de cellules épithéliales indifférenciées telles qu'un état prolifératif et une absence de bordure en brosse. Toutefois, suite à l'atteinte de la confluence, les Caco-2/15 entreprennent spontanément un processus de différenciation entérocytaire marqué par l'émergence d'un état de polarisation, d'une bordure en brosse ainsi que

l'expression de marqueurs de différenciation terminal tel que la sucrase-isomaltase (Sambuy et al., 2005). Par des essais de PCR, nous avons démontré que les messagers encodant les facteurs de transcription Cdx-2 et HNF1 α sont présents à tous les stades de confluence chez les cellules Caco-2/15. À l'opposé, aucune expression de Cdx-2 ni de HNF1 α n'est observée chez les cellules HIEC. L'absence d'expression de ces facteurs de transcription est accompagnée d'une absence des marqueurs de différenciation Li et E-cadhérine, DPPIV et sucrase-isomaltase (Figure 6A). Des essais d'immunofluorescence sur des sections d'iléons adultes humains ont démontrés une absence de ces deux mêmes facteurs de transcription chez un nombre très limité de cellules épithéliales localisées au fond des compartiments cryptaux (Figure 6D). Cette observation fait contraste avec la forte présence de Cdx-2 et HNF1 α au niveau des cellules épithéliales dans l'ensemble de l'axe crypte-villosité (Figure 6B, C). Ainsi, l'absence de Cdx-2 et HNF1 α chez ces cellules cryptales est en concordance avec l'état indifférencié des cellules souches et progénitrices intestinales et pourrait expliquer du même coup l'incapacité des cellules HIEC à entreprendre un programme de différenciation (Escaffit et al., 2005b; Pageot et al., 2000).

Figure 6: Les cellules indifférenciées des cryptes intestinales humaines n'expriment pas Cdx-2 et HNF1 α

(A) Analyses RT-PCR représentatives de la détection des messagers encodant les facteurs de transcription Cdx-2 et HNF1 α ainsi que les marqueurs de différenciation sucrase-isomaltase, DPPIV, Li-Cadhérine et E-cadhérine. Les analyses ont été faites chez les Caco-2/15 en différenciation (5 et 10 jours post-confluence) ainsi que chez les cellules HIEC. Tandis que les Caco-2/15 expriment fortement tous ces marqueurs, les HIEC ne démontrent que des traces d'expression de DPPIV. On note aussi une absence des messagers de Cdx-2 et HNF1 α chez les cellules HIEC. L'expression de la β -actine a été analysée comme contrôle de normalisation. (B-D) Immunofluorescences sur coupes cryogéniques représentatives de la détection de HNF1 α en rouge (B,C,D) et de Cdx-2 en vert (B',C',D') dans l'iléon proximal humain. Le patron de marquage démontre une distribution nucléaire de ces deux facteurs de transcription chez les cellules épithéliales, tant au niveau de la villosité (B,B') qu'au niveau de la portion supérieure de la crypte (C,C') (Barre=100 μ m). Un plus fort grossissement de la région cryptale dévoile un nombre limité de cellules, négatives pour le marquage de HNF1 α en rouge (D) et le marquage de Cdx-2 en vert (D'), localisées à la base des cryptes en question. La superposition des images D et D' (D'') confirme que les cellules HNF1 α négatives sont aussi dépourvu de Cdx-2 (Flèches) (Barre=20 μ m).



Tiré de Benoit & al., Am J Physiol Gastroint Liver Physiol. 2010

Figure-6: Les cellules indifférenciées des cryptes intestinales humaines n'expriment pas Cdx-2 et HNF1α

3.2 Établissement et caractérisation de lignées HIEC exprimant les facteurs Cdx-2 et HNF1α de manière inductible

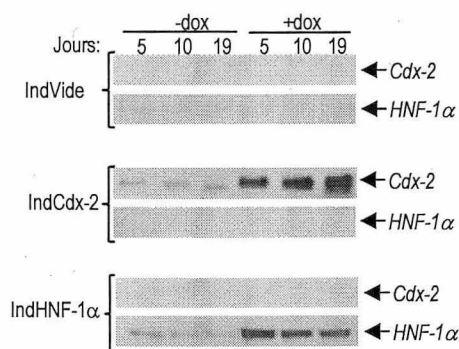
Dans le but d'analyser le rôle des facteurs de transcription Cdx-2 et HNF1α chez les cellules cryptales de l'intestin humain, nous avons établi une stratégie basée sur des infections rétrovirales, afin de générer des lignées stables de cellules HIEC exprimant chacun des deux facteurs de transcription de manière inductible. Dans ce contexte, l'utilisation du système d'expression génétique tetON permet de contrôler l'induction de gènes d'intérêt via l'ajout de doxycycline, un analogue synthétique de la tétracycline, dans le milieu de culture des cellules. D'une part, nous avons démontré que les lignées stables de cellules HIEC inductibles expriment massivement Cdx-2 ou HNF1α en présence de doxycycline (Figure 7A). Dans chacun des cas, l'expression d'un facteur de transcription n'a pas d'effet inducteur sur l'expression de l'autre. De plus, une faible expression des deux transgènes est détectée en absence de doxycycline. Un tel phénomène entraîne donc la présence d'une expression basale de Cdx-2 ou HNF1α chez les cellules non-induites (Figure 7A). Cette observation n'a toutefois pas été faite chez les cellules inductibles contrôles (IndVide). Les effets reliés à l'expression de Cdx-2 et HNF1α chez les cellules HIEC ont d'abord été étudiés au niveau de la prolifération cellulaire. Des études réalisées auparavant par Dr Fabrice Escaffit, au sein de l'équipe de recherche du Dr Beaulieu, ont démontré que l'expression individuelle de Cdx-2 et HNF1α chez les HIEC conduisait à une baisse de la prolifération d'environ 50% et 35% respectivement au stade 15 jours post-

induction (Benoit et al., 2010b; Escaffit et al., 2006). Par des analyses cytométriques par balayage laser en conditions adhérentes, nous avons pu établir le profil de distribution, à travers les différentes phases du cycle cellulaire, des cellules exprimant Cdx-2 seul et en combinaison avec HNF1 α . Ces observations ont été réalisées 3 jours après le début de l'induction à la doxycycline. La surexpression de Cdx-2 chez les HIEC entraîne une accumulation significative en phase G1 ainsi qu'une diminution des proportions de cellules retrouvées en phase S comparativement aux conditions contrôles (Figure 7B). D'autre part, l'expression combinée de Cdx-2 et HNF1 α conduit à un effet significativement additif au niveau du ralentissement de la progression du cycle cellulaire, de la phase G1 à la phase S, chez les cellules HIEC (Figure 7B). Afin d'élucider les rôles de ces facteurs de transcription dans la progression du cycle cellulaire chez les progéniteurs de la crypte intestinale humaine, nous avons quantifié les niveaux d'expression de cycline D1 et p27^{KIP1} chez les HIEC exprimant Cdx-2 ou HNF1 α individuellement. En accord avec ce qu'il fût démontré auparavant (Escaffit et al., 2006), la surexpression de Cdx-2 chez les HIEC conduit à une diminution de 46% des niveaux d'expression de cycline D1 comparativement aux HIEC contrôles (IndVide + dox) (Figure 7C). Aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'expression de p27^{KIP1} chez les HIEC/indCdx-2 induites comparativement aux cellules contrôles (IndVide + dox). Pour sa part, la surexpression de HNF1 α n'influence pas de manière significative l'expression de cycline D1. Toutefois, elle conduit à une augmentation (~2 fois) des niveaux de p27^{KIP1} (Figure 7D). Ces résultats suggèrent ainsi que chacun de ces deux facteurs

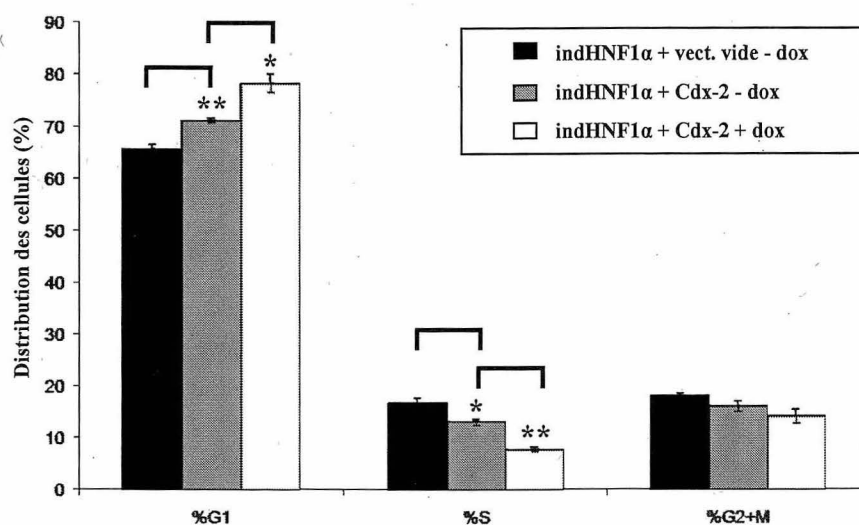
Figure 7: Caractérisation des HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1 α au niveau de la prolifération cellulaire

(A) Analyses par immunobuvardage démontrant l'expression inductible de Cdx-2 et de HNF1 α chez les cellules HIEC. La détection de la cytokératine-18 a été utilisée comme contrôle de normalisation (non illustré). (B) Histogramme illustrant le pourcentage de cellules distribuées dans les différentes phases du cycle cellulaire, soit G1, S et G2 + M, pour les HIEC/indHNF1 α + vecteur vide - dox, les HIEC/indHNF1 α + Cdx-2 - dox et les HIEC/indHNF1 α + Cdx-2 + dox. Ces données ont été obtenues suite à des expériences de cytométrie par balayage laser en conditions adhérentes (iCys) (n=3, *: p \leq 0,03, **: p \leq 0,005). Les quantités relatives de cycline D1 (C) et de p27^{KIP1} (D) ont été évaluées par immunobuvardage et par des analyses densitométriques. La détection de la cytokératine-18 a été utilisée comme contrôle de normalisation (n=3, *: p=0,023, **: p=0,001).

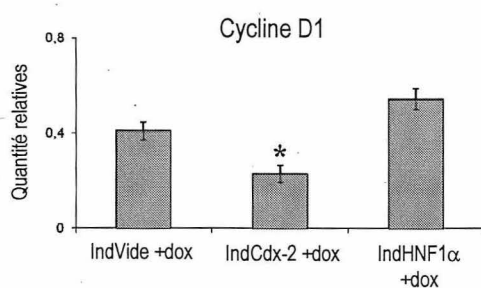
A



B



C



D

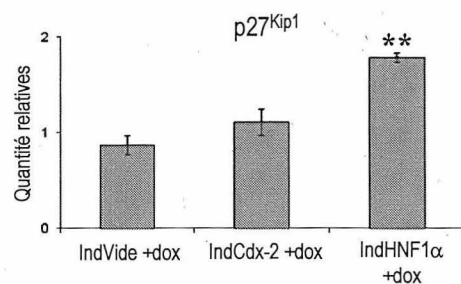


Figure-7: Caractérisation des HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1α au niveau de la prolifération cellulaire

de transcription ont un rôle répressif sur la prolifération cellulaire, à travers deux mécanismes moléculaires différents.

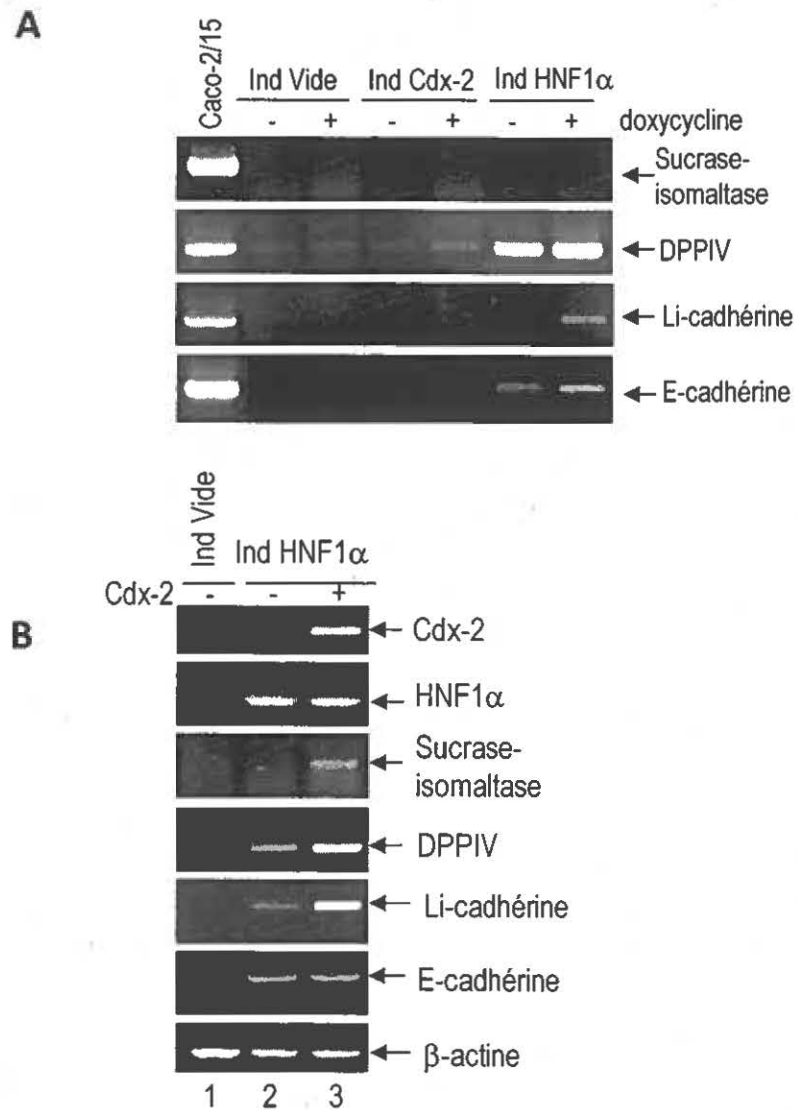
3.3 Expression des marqueurs de différenciation intestinaux chez les HIEC Cdx-2 et HNF1 α inductibles

L'effet entraîné par l'expression individuelle des facteurs de transcription Cdx-2 et HNF1 α , au niveau de la différenciation des cellules HIEC, a été évalué selon l'induction de gènes encodant différents marqueurs bien établis de la différenciation entérocytaire. Par des essais en RT-PCR, nous avons déterminé la présence ou l'absence des ARNm de la sucrase-isomaltase, la DPPIV ainsi que des Li et E-cadhérines dans différents contextes chez les HIEC. Les cellules induites pour l'expression de Cdx-2 ne démontrent qu'une très faible expression du messenger de DPPIV. Toutefois, l'induction de HNF1 α conduit à une expression significative du messenger de DPPIV ainsi qu'à l'apparition des messagers de la Li-cadhérine et la E-cadhérine (Figure 8A). Il est à noter que le niveau d'expression basal de HNF1 α chez les cellules non-induites est suffisant pour induire l'expression du messenger de DPPIV. Cependant, la surexpression de HNF1 α chez les HIEC n'a pas conduit à l'induction de l'expression du messenger de la sucrase-isomaltase (Figure 8A).

Considérant le rôle important de HNF1 α dans l'induction des marqueurs de différenciation entérocytaire, nous avons ensuite étudié l'impact à ce niveau d'une

Figure 8: Analyses RT-PCR de l'induction des marqueurs de différenciation entérocytaire chez les HIEC

(A) Détection des messagers encodant divers marqueurs de différenciation entérocytaire chez des populations de HIEC induites (+) et non-induites (-). Les cellules Caco-2/15 ont été utilisées comme contrôle positif. Cdx-2 démontre peu d'effet sur l'expression des marqueurs de différenciation (piste 5) comparativement à HNF1 α qui induit DPPIV, Li-cadhérine et E-cadhérine (piste 7). (B) Détection des messagers de divers marqueurs de différenciation chez les HIEC/indHNF1 α induites réinfectées avec un virus contrôle (piste 2) ou un virus permettant l'expression constitutive de Cdx-2 (piste 3). Les cellules HIEC/indVide + dox ont été utilisées comme contrôle (piste 1). L'expression de la β -actine a été analysée comme contrôle de normalisation. La combinaison de Cdx-2 et HNF1 α permet l'induction du marqueur de différenciation terminale sucrase-isomaltase.



Tiré de Benoit & al., Am J Physiol Gastroint Liver Physiol. 2010

Figure-8: Analyses RT-PCR de l'induction des marqueurs de différenciation entérocytaire chez les HIEC

expression constitutive de Cdx-2 chez les cellules HIEC/indHNF1 α . Des observations en RT-PCR ont été faites sur des cellules ayant été exposées pendant 4 jours à une expression combinée de Cdx-2 et HNF1 α . Dans un tel contexte, la combinaison Cdx-2/HNF1 α permet l'induction de niveaux détectables du messager de la sucrase-isomaltase chez les HIEC (Figure 8B). De plus, une augmentation apparente des niveaux de messagers de DPPIV et de Li-cadhérine a été observée dans ces mêmes conditions (Figure 8B, piste #3). Finalement, l'expression combinée de Cdx-2 et HNF1 α chez les HIEC n'a démontré aucun effet additif sur l'expression de la E-cadhérine comparativement aux cellules HIEC/indHNF1 α .

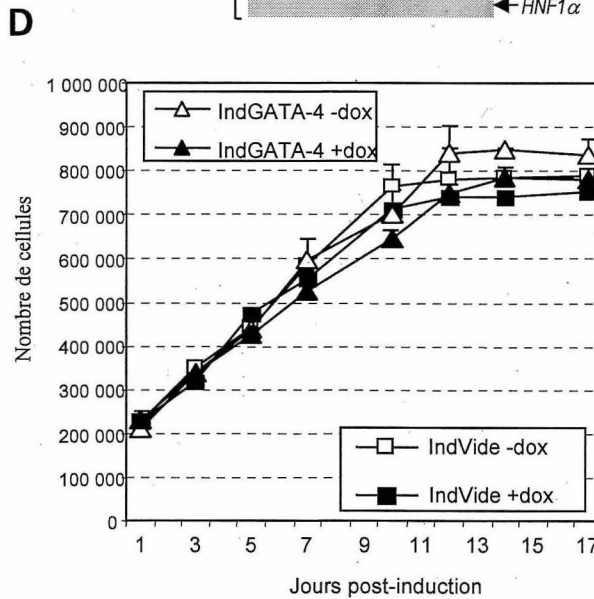
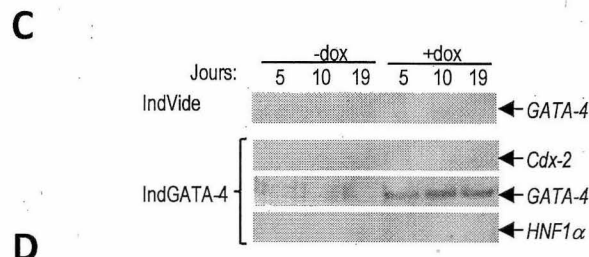
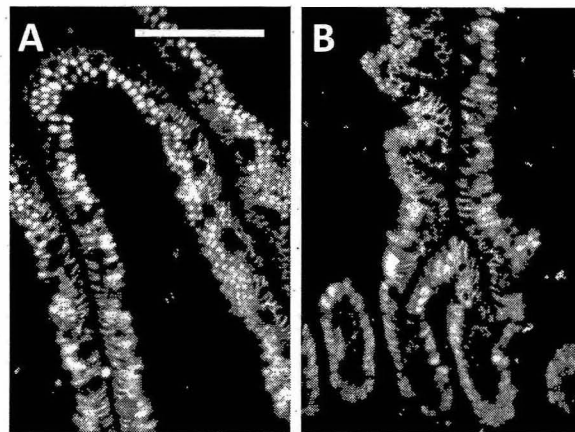
3.4 GATA-4 constitue un autre joueur clé dans la différenciation entérocytaire humaine

Les facteurs de transcription de type doigts de zinc de la famille GATA ont été étudiés de manière exhaustive dans le contexte de la différenciation cellulaire. Plus spécifiquement, le facteur GATA-4 est reconnu pour participer, seul ou en collaboration avec les facteurs de types Cdx et/ou HNF, à la régulation de gènes dont les produits sont spécifiques aux entérocytes différenciés (Boudreau et al., 2002; Escaffit et al., 2005a; van Wering et al., 2004). Toujours dans un contexte intestinal, GATA-4 a été étroitement associé à la spécification proximo-distale physiologique ainsi qu'au devenir cellulaire (Beuling et al., 2008; Bosse et al.,

2006a). Des expériences en immunofluorescence sur des sections d'iléons adultes humains nous ont permis de démontrer que GATA-4 est présent de manière uniforme dans les noyaux des cellules épithéliales des compartiments cryptaux (Figure 9A) et villositaires (Figure 9B). Ainsi, le patron d'expression de GATA-4 s'apparente grandement à ceux observés pour les facteurs Cdx-2 et HNF1 α au niveau de la muqueuse intestinale humaine. Dans le but d'étudier la fonction du facteur GATA-4 chez les cellules épithéliales de la crypte, nous avons employé la même stratégie de transfert de gène, par le biais d'infections virales, afin de générer des lignées stables de HIEC exprimant GATA-4 de manière inducible. En présence de doxycycline, ces lignées stables HIEC/indGATA-4 ont démontré des niveaux d'expression considérables de la protéine GATA-4 (Figure 9C). De plus, la surexpression de GATA-4 chez les cellules HIEC n'induit aucunement l'expression des facteurs Cdx-2 et HNF1 α . Une faible expression basale de GATA-4 a été détectée chez les cellules HIEC/indGATA-4 en absence de doxycycline (Figure 9C). La présence de ce niveau de base n'est toutefois pas observée chez les cellules contrôles (IndVide). L'établissement de courbes de croissance à partir de cultures de HIEC/indGATA-4 a démontré que la surexpression de ce facteur de transcription n'entraîne aucun effet significatif sur la prolifération des cellules crypte intestinal humaines (Figure 9D).

Figure 9: Distribution du facteur GATA-4 dans la muqueuse intestinale humaine et son effet sur la prolifération cellulaire

Détection de GATA-4 en immunofluorescence sur des coupes cryogéniques d'iléon adulte humain au niveau de la villosité (A) et de la crypte (B) (Barre = 100 μ m). Le marquage nucléaire correspondant à la présence de GATA-4 est ubiquitaire au niveau de l'épithélium, à partir du tiers inférieur jusqu'à l'apex de la villosité. (C) Immunobuvardage démontrant l'expression de GATA-4 dans les lignées HIEC inductibles. Des niveaux significatifs de GATA-4 ont été détectés uniquement chez les HIEC/indGATA-4 induites. (D) Courbes de croissance impliquant les cellules HIEC/indGATA-4 et démontrant l'absence d'effet significatif de ce facteur sur la prolifération. Les HIEC/indVide (+/- dox) ont été utilisées comme contrôle.



Tiré de Benoit & al., Am J Physiol Gastroint Liver Physiol. 2010

Figure-9: Distribution du facteur GATA-4 dans la muqueuse intestinale humaine et son effet sur la prolifération cellulaire

3.5 Génération et caractérisation de lignées HIEC double inductibles Cdx-2/HNF1α avec ou sans expression de GATA-4

L'expression combinée des facteurs de transcription Cdx-2 et HNF1α entraîne l'initiation de la différenciation fonctionnelle chez les cellules HIEC. Ainsi, nous avons décidé de générer un modèle permettant l'expression simultanée de ces deux facteurs en fonction de la présence de doxycycline. La perspective d'un tel modèle nous permet de contrôler l'expression de deux facteurs nuisant à la croissance cellulaire, soit Cdx-2 et HNF1α, en présence ou en absence d'une expression constitutive de GATA-4. Cette stratégie permettra l'étude de l'effet coopératif de ces 3 facteurs sur la différenciation entérocytaire. Cette lignée cellulaire, appelée HIEC^{IndHNF1α/Cdx-2}, démontre de faibles niveaux d'expression de HNF1α ainsi qu'aucune expression de Cdx-2 et de GATA-4 en absence de doxycycline. Suite à l'ajout de doxycycline, l'expression des protéines Cdx-2 et HNF1α est fortement induite tandis que GATA-4 reste absent (Figure 10A).

Tel qu'attendu, certains effets reliés à l'expression basale de HNF1α dans notre système ont été observés en absence de doxycycline. En effet, on note dans ce contexte une induction de DPPIV (Figure 10B, piste #2) ainsi qu'un déclenchement de l'expression de Li-cadhérine lorsque GATA-4 est constitutivement exprimé (Figure 10B, piste #4). Il est aussi intéressant de noter que la présence seule de GATA-4 parvient à induire l'expression de DPPIV (Figure 10B, piste #3 et #7). En présence de doxycycline, l'expression combinée

Figure 10: Caractérisation des cellules HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} et l'impact d'une combinaison HNF1 α /Cdx-2/GATA-4 sur la différenciation fonctionnelle

(A) Analyse par immunobuvardage exposant les niveaux d'expression de base de HNF1 α en absence (-) de doxycycline chez les HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2}. (B) Analyses RT-PCR représentatives de la détection de la sucrase-isomaltase, la DPPIV, la Li-cadhérine et la E-cadhérine chez les cellules HIEC/indVide et HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} induites (+) et non-induites (-), en présence ou en absence de GATA-4. Les cellules Caco-2/15 post-confluentes ont été utilisées comme contrôle. Des essais en PCR quantitatif démontrent que l'addition de GATA-4 conduit à une hausse significative de l'expression de Li-cadhérine et à une baisse de E-cadhérine (C) (n=3, **: p \leq 0,01). (D) Des analyses en immunobuvardage confirment la baisse d'expression de E-cadhérine en réponse à l'expression de GATA-4 chez les HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2}.

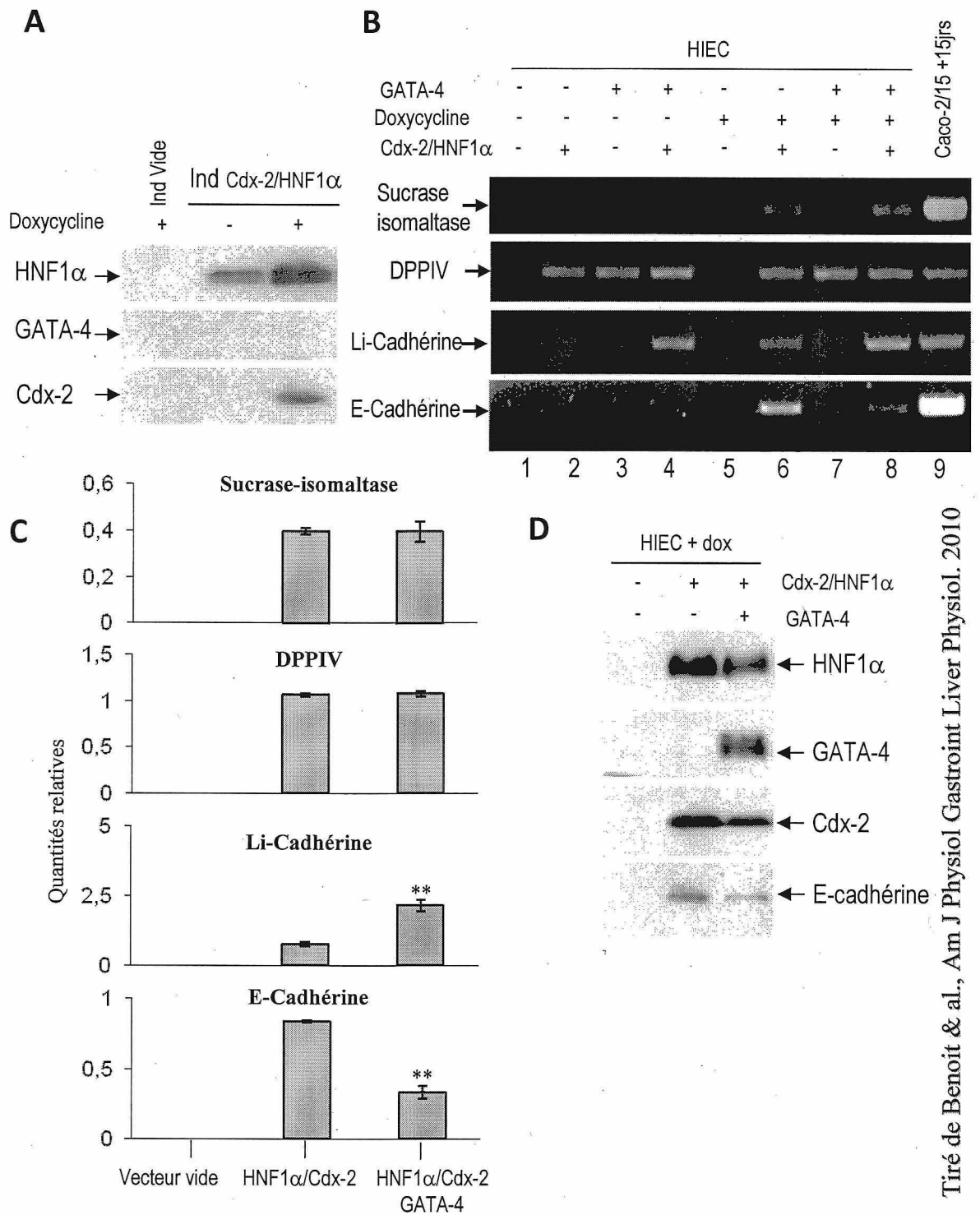


Figure-10: Distribution du facteur GATA-4 dans la muqueuse intestinale humaine et son effet sur la prolifération cellulaire

de Cdx-2 et HNF1 α est suffisante au déclenchement de l'expression de DPPIV, de Li-cadhérine, de E-Cadhérine et de la sucrase-isomaltase (Figure 10B, piste #6, Figure 8C). L'infection subséquente des HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} par un lentivirus permettant l'expression constitutive de GATA-4, a conduit à une augmentation des niveaux de Li-cadhérine, qui fût ensuite confirmée par PCR quantitatif (Figure 10B, piste #8, Figure 10C). Toutefois, l'ajout de GATA-4 à notre système n'a entraîné aucun changement des niveaux d'expression des ARNm de DPPIV et de la sucrase-isomaltase (Figure 10B, piste #8, Figure 10C). Toutefois, une diminution significative de l'expression de la E-cadhérine a été observée chez les cellules HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} induites en présence de GATA-4 comparativement aux cellules contrôles (HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} + dox). Cette diminution a été observée autant au niveau du messenger (Figure 10C) que de la protéine (Figure 10D). Un tel résultat suggère ainsi un rôle complexe pour GATA-4 dans la régulation transcriptionnelle des gènes liés à la différenciation intestinale. En somme, les essais en PCR quantitatifs ont révélé que GATA-4, en présence de Cdx-2 et HNF1 α , entraîne une augmentation de 8,6 fois des niveaux de messenger de Li-cadhérine et une diminution de 2,4 fois des niveaux de messenger de E-cadhérine par rapport aux cellules HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} induites n'exprimant pas GATA-4 (Figure 10C).

3.6 L'expression combinée de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 dirige spécifiquement la différenciation des HIEC vers la voie absorbante

Tel que mentionné précédemment, le devenir cellulaire intestinal est étroitement gouverné par la voie de signalisation Notch. Plus précisément, c'est le ratio d'expression des facteurs de transcription Hath-1 et Hes-1 qui dictera la voie de différenciation qu'empruntera la cellule intestinale. Par exemple, si ce ratio penche en faveur d'une expression plus élevée de Hes-1, la cellule en question entreprendra une différenciation entérocytaire. À l'opposé, un ratio penchant vers une plus forte expression de Hath-1 entraîne la différenciation vers la voie sécrétrice. Prenant en ligne de compte que la surexpression des facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 induit l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaire, nous avons voulu savoir si ces mêmes facteurs de transcription exerçaient un rôle à la base même de la détermination du devenir cellulaire. Par des essais en RT-PCR, nous avons d'abord observé que l'expression de Cdx-2 et HNF1 α n'avait aucun impact sur l'expression de Hes-1 et Hath-1 chez les HIEC comparativement aux conditions contrôles. Toutefois, l'expression de GATA-4 seul contribue à une diminution marquée de l'expression de Hath-1 sans influencer les niveaux de Hes-1. La combinaison de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 conduit à une inhibition totale de l'expression de Hath-1 chez les HIEC (Figure 11A). Un tel phénomène suggère donc que le système de surexpression des facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 chez les HIEC contribue à l'établissement d'un ratio Hath-1 versus Hes-1 favorisant la différenciation vers la voie

Figure 11: Effet de l'expression combinée de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 dans la détermination du devenir cellulaire chez les HIEC

(A) Analyses RT-PCR représentatives des niveaux d'expression des effecteurs de la voie notch, Hath-1 et Hes-1, chez les cellules HIEC en fonction de la présence des de transcription pro-différenciation Cdx-2, HNF1 α et GATA-4. L'expression de RPLP0 a été analysée comme contrôle de normalisation. (B) Expériences de RT-PCR représentatives de l'expression de marqueurs spécifiques des cellules caliciformes (Muc2), des cellules entéroendocrines (Chromogranine A) et des cellules de Paneth (Défensine-5) chez les HIEC selon différentes conditions d'expression des facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4. Des fractions épithéliales d'iléon adultes ont été utilisées comme contrôle positif.

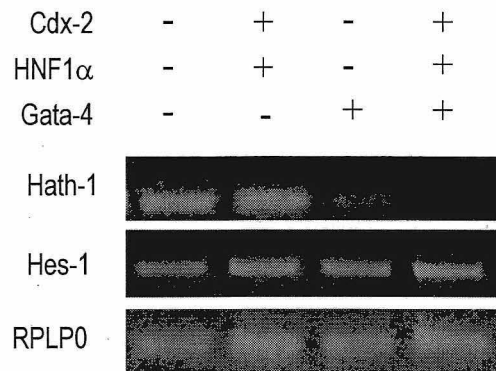
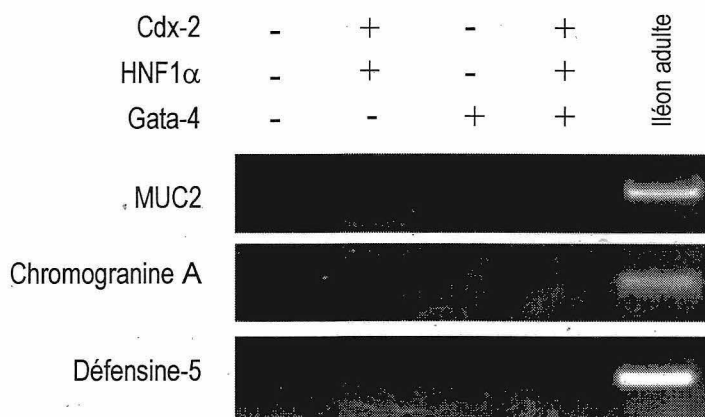
A**B**

Figure-11: Effet de l'expression combinée de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 dans la détermination du devenir cellulaire chez les HIEC

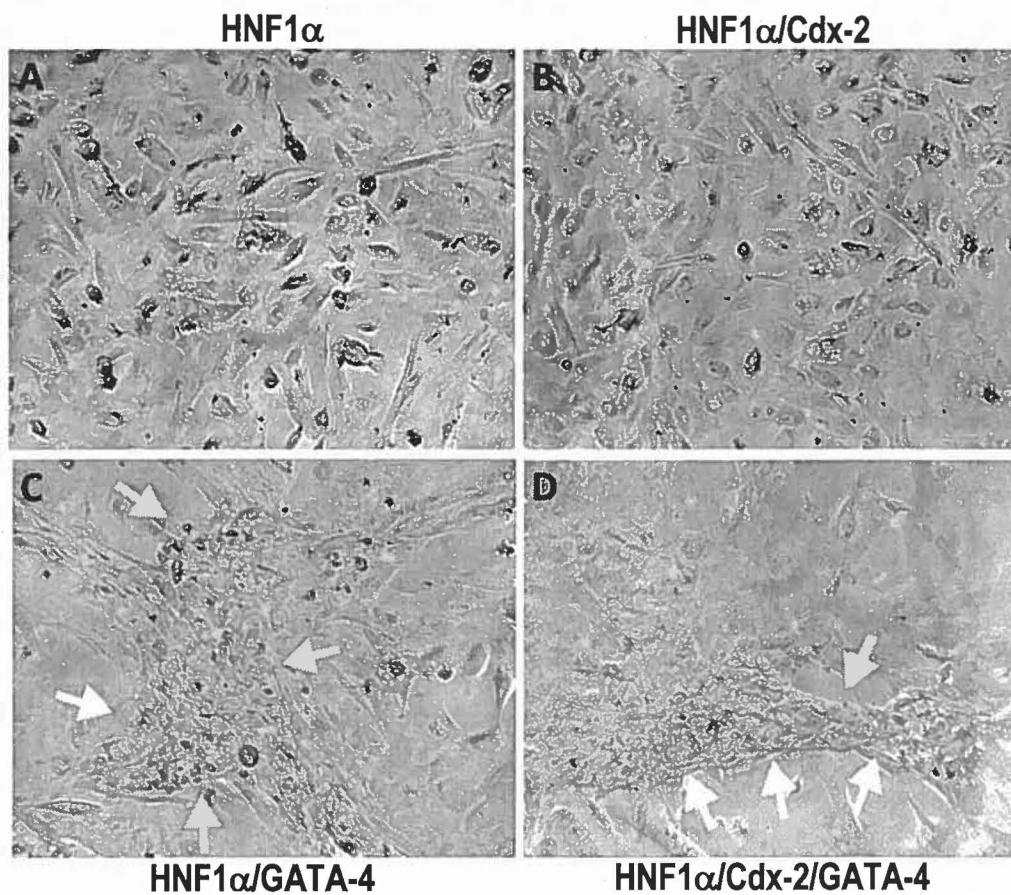
absorbante. De surcroît, les principaux marqueurs de différenciation des 3 types cellulaires issus de la voie sécrétrice se sont révélés absents chez les cellules HIEC en présence et en absence des facteurs de transcription pro-différenciation (Figure 11B).

3.7 Influence du facteur GATA-4 dans l'acquisition de propriétés morphologiques associées aux entérocytes

Toujours en considérant l'effet de Cdx-2 et HNF1 α sur l'induction des différents marqueurs de différenciation entérocytaire, nous avons porté notre attention sur un impact potentiel de ces facteurs de transcription dans la polarisation des cellules HIEC. D'une part, des observations en microscopie à contraste de phase n'ont démontré aucune différence morphologique majeure entre les cultures de HIEC/indHNF1 α (Figure 12A) et de HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} (Figure 12B), induites à la doxycycline dans les deux cas et à 30 jours post-confluence. Par contre, ces mêmes cellules induites subissent d'importants changements morphologiques caractérisés par l'apparition de structures trabéculaires lorsqu'elles expriment le facteur GATA-4 de manière constitutive (Figure 12C, D). Conséquemment, des observations en microscopie électronique ont révélé l'émergence de caractéristiques supplémentaires associées aux entérocytes et découlant de la combinaison des facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4. D'abord, tel qu'observé

Figure 12: Observations des changements morphologiques induits par l'expression de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 chez les cellules HIEC

Images prises en microscopie à contraste de phase illustrant les changements morphologiques observés dans les cultures de HIEC/indHNF1 α en absence (A) et en présence d'une expression constitutive de GATA-4 (C), ainsi que chez les cellules HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} + dox en absence (B) et en présence de GATA-4 (D). L'expression de GATA-4 influence un remodelage de la monocouche de HIEC vers la formation de structures trabéculaires (Flèches sur les images C et D).



Tiré de Benoit & al., Am J Physiol Gastroint Liver Physiol. 2010

Figure-12: Observations des changements morphologiques induits par l'expression de Cdx-2, HNF1α et GATA-4 chez les cellules HIEC

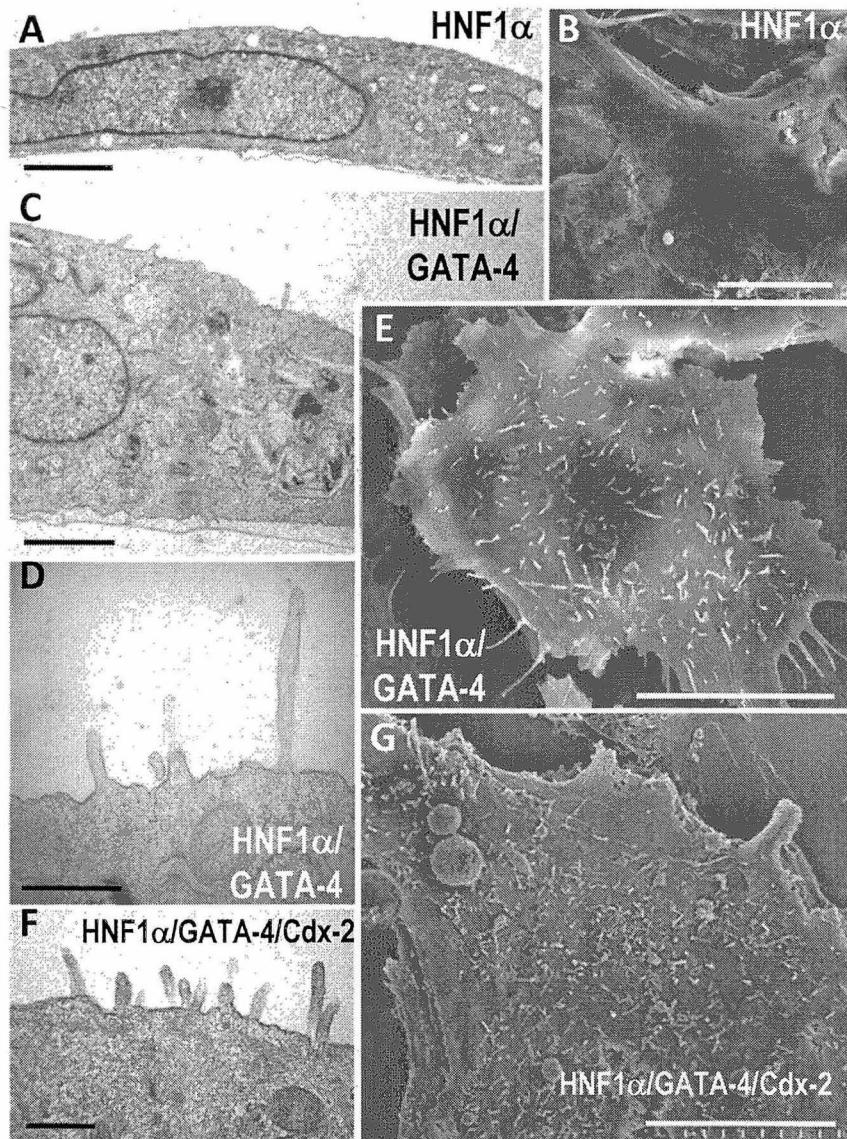
auparavant chez les cellules HIEC de type sauvage, les HIEC/indHNF1 α induites ne présentent aucune structure morphologique reliée à la différenciation entérocytaire. En fait, les HIEC exprimant HNF1 α démontrent un faible niveau organisationnel de leur cytoplasme ainsi qu'une membrane plasmique lisse et uniforme (Figure 13A, B). À l'opposé, l'introduction du facteur GATA-4 chez les HIEC/HNF1 α induites entraîne l'apparition de quelques microvillosités à la surface luminale des cellules en plus de démontrer un degré d'organisation plus élevé du cytoplasme (Figure 13C, D, E). Une densité plus importante et une meilleure organisation de ces microvillosités ont été observées lorsque les 3 facteurs de transcription Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 sont conjointement exprimés chez les HIEC (Figure 13F, G).

3.8 Analyse comparative des profils d'expression génétique des cellules HIEC exprimant les facteurs Cdx-2 et HNF1 α en présence et en absence de GATA-4

Des expériences de micropuces à ADN ont permis d'approfondir nos études sur l'impact de l'expression combinée des facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 au niveau des cellules de la crypte intestinale humaine. En utilisant les cellules HIEC de type sauvage comme contrôle, nous avons comparé les profils d'expression génétique des deux conditions favorisant le plus la différenciation entérocytaire, soit les HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} induites et les HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} induites + GATA-4. Parmi les 19 200 clones d'ADNc présents sur les micropuces, 12 858 d'entre eux

Figure 13: Caractérisation ultrastructurale de la morphologie des cellules HIEC exprimant les facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4

Observations en microscopie électronique à transmission (A,C,D,F) et à balayage (B,E,G) chez les cellules HIEC exprimant différentes combinaisons des facteurs de transcription Cdx-2, HNF1 α et GATA-4. Les conditions HIEC/indHNF1 α + vecteur vide + dox (A et B), HIEC/indHNF1 α + GATA-4 + dox (C,D,E) et HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} + GATA-4 + dox (F et G) ont été caractérisées. La présence de GATA-4 chez les cellules HIEC entraîne l'apparition de changements morphologiques attribuables à la différenciation entérocytaire. Barres=2 μ m pour A et C, 10 μ m pour B, E et G, 500 nm pour D et F.



Tiré de Benoit & al., Am J Physiol Gastroint Liver Physiol. 2010

Figure-13: Caractérisation ultrastructurale de la morphologie des cellules HIEC exprimant les facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4

ont pu être évalués dans au moins 3 analyses sur 4 et inclus dans les études statistiques. Au total, 237 gènes appartenant à diverses catégories fonctionnelles ont été démontré comme étant modulés dans chacune des conditions étudiées. L'observation des cartes de regroupement de gènes, où la couleur verte signifie une sous-expression et la couleur rouge correspond à une surexpression, démontre une distinction claire entre les profils d'expression des deux modèles de différenciation étudiés (Figure 14A). D'un point de vue intéressant, parmi les 215 gènes modulés de façon significative chez les HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} induites par rapport aux HIEC contrôles, la majorité de ceux inclus dans les catégories «transport» (15 gènes), «transduction de signaux» (21 gènes) et «cycle cellulaire & prolifération» (11 gènes) ont démontré une diminution de leur activation transcriptionnelle (Figure 14B). Chez les cellules HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} induites exprimant GATA-4, l'expression de 225 gènes est significativement altérée, dont 140 démontrent une hausse de leur activation transcriptionnelle. Parmi ces gènes, plusieurs appartiennent aux catégories «transport» (17 gènes), «transduction de signaux» (20 gènes), «cycle cellulaire & prolifération» (11 gènes) et «métabolisme» (9 gènes). Considérant l'apparition de structures morphologiques et l'initiation d'une polarité relative aux entérocytes suite à l'introduction de GATA-4 à notre système de surexpression, nous avons procédé à une analyse de classification fonctionnelle des gènes modulés chez les cellules HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} induites + GATA-4 par rapport aux cellules HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2} induites. De ce fait, 5 gènes associés à la morphologie et polarité cellulaire ont été recensé comme étant surexprimés en présence de GATA-4 (Tableau-5). Ainsi, des essais en PCR

Figure 14: Analyse comparative des profils d'expression génétique des cellules HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1 α en présence et en absence de GATA-4

(A) Représentation colorimétrique des patrons d'expression observés suite à des analyses par micropuces à ADN faites à partir d'échantillons d'ADNc de HIEC^{indCdx-2/HNF1 α} induites, +/- GATA-4. Pour les 19 200 gènes représentés sur chaque micropuce, le vert représente un état sous-exprimé tandis que le rouge correspond à une surexpression. (B) Les différents gènes significativement modulés en réponse à l'expression de Cdx-2/HNF1 α et Cdx-2/HNF1 α + GATA-4, comparativement aux cellules contrôles HIEC/indVide, ont été classés selon les différents processus biologiques auxquels ils sont principalement associés ($p \leq 0,05$). (C) Analyses par PCR quantitatif validant la surexpression des gènes associés à la polarité cellulaire originalement observés par micropuces à ADN. L'augmentation de l'expression de la ZO-2, de la cinguline, de la villine-2, de la claudine-11 et de la calbindine-2 a été confirmé chez les HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} + GATA-4 par rapport aux HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} + vecteur vide ($n=3$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,005$).

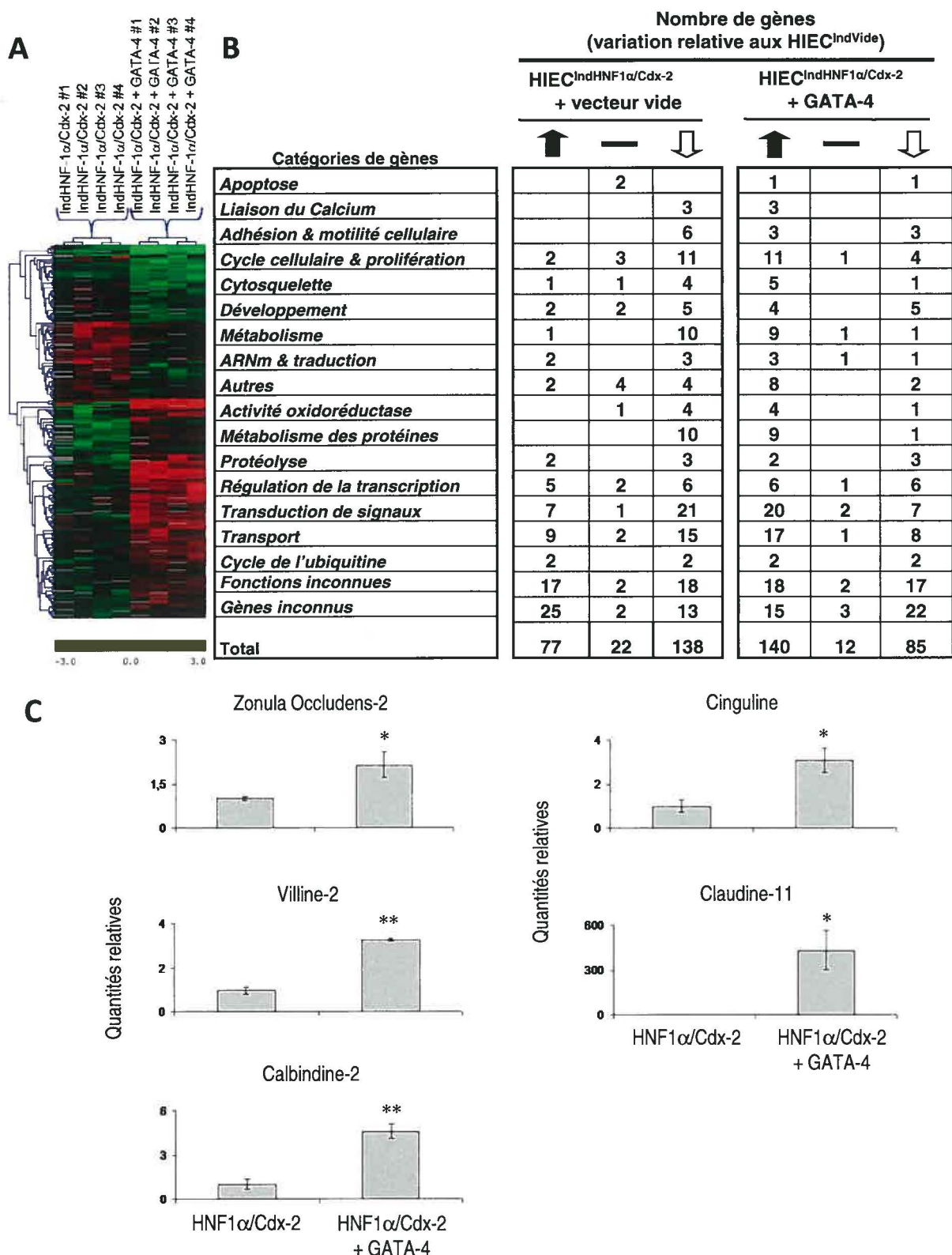


Figure-14: Analyse comparative des profils d'expression génétique des cellules HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1α en présence et en absence de GATA-4

quantitatif ont confirmé la surexpression significative des messagers encodant ZO-2, la cinguline et la claudine-11, tous des facteurs associés aux jonctions serrées (Citi et al., 2009; Gonzalez-Mariscal et al., 2009; Lui et al., 2007). De plus, les messagers de la calbindine-2, une protéine importante pour le transport du calcium (Feher et al., 1992), ainsi que de la villine-2, qui est impliquée dans l'organisation des microvillosités (Morales et al., 2004), ont été confirmés comme étant significativement surexprimés (Figure 14C). Mises ensemble, ces observations renforcent l'idée d'un rôle crucial pour GATA-4 dans l'établissement de la polarité entérocytaire.

Tableau-5: L'ajout de GATA-4 au système Cdx-2/HNF1 α augmente l'expression de marqueurs fonctionnels de la polarité cellulaire chez les HIEC

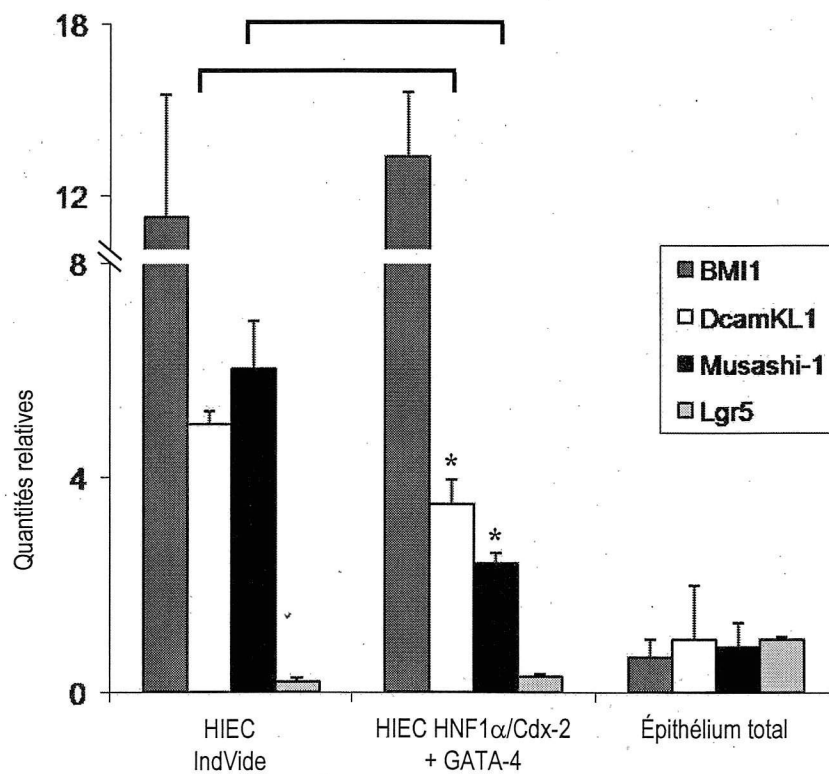
Gènes différentiellement exprimés en présence de GATA-4 (HIEC ^{indHNF1α/Cdx-2})		
Gène	Augmentations p < 0.05	Localisation / fonction
Zonula occludens-2	1.58 x	Intégrité des jonctions serrées
Claudine-11	3.11 x	Intégrité des jonctions serrées
Cinguline	1.93 x	Intégrité des jonctions serrées
Calbindine-2	2.88 x	Transport du calcium
Villin-2 (ezrine)	3.40 x	Liaison membrane/actine (microvillosité)

3.9 L'initiation du processus de différenciation entérocytaire influence l'expression de certains marqueurs des cellules souches intestinales chez les HIEC

Les analyses par micropuces à ADN nous ont aussi révélé que l'activité transcriptionnelle du gène encodant le marqueur spécifique de cellules souches intestinales DcamKL1 était diminuée chez les cellules exprimant Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 comparativement aux cellules HIEC contrôles (IndVide). Considérant le statut indifférencié des cellules HIEC, nous avons effectué des analyses en PCR quantitatif afin de déterminer si les gènes exprimant les marqueurs des cellules souches intestinales DcamKL1, Bmi-1, Lgr5 et Musashi-1 subissaient une modulation quelconque suite à l'induction du processus de différenciation entérocytaire. Au cours de ces essais, des échantillons d'ADNc de la fraction épithéliale de l'iléon adulte humain ont été utilisés comme contrôle. Même si les niveaux d'expression de Lgr5 observés sont très négligeables, les 3 autres marqueurs des cellules souches intestinales sont fortement exprimés par les cellules HIEC comparativement à la fraction épithéliale pure (Figure 15). De plus, l'enclenchement du processus de différenciation entérocytaire cause une diminution de l'expression des messagers de DcamKL1 et Musashi-1 de l'ordre de 30% et 58% respectivement tandis que les niveaux de Bmi-1 restent inchangés (Figure 15). Ces résultats suggèrent donc que l'expression de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 entraîne la détermination des cellules intestinales indifférenciées, caractérisée par la chute de l'expression de certains marqueurs des cellules souches intestinales. Cependant, il semblerait que le facteur Bmi-1, qui appartient

Figure 15: Influence des facteurs de transcription pro-différenciation sur l'expression des marqueurs de cellules souches/progénitrices intestinales

Expériences en PCR quantitatif démontrant les niveaux d'expression des messagers de Bmi-1, DcamKL1, Musashi-1 et Lgr5 chez les cellules HIEC/indVide et HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} + GATA-4 comparativement à la fraction épithéliale d'iléons adultes. Une diminution significative de l'expression de DcamKL1 et Musashi-1 est observée suite à l'induction de la différenciation entérocytaire chez les HIEC comparativement aux conditions contrôles (HIEC/indVide) (n=3, *: $p \leq 0,031$).



Tiré de Benoit & al., Am J Physiol Gastroint Liver Physiol. 2010

Figure-15: Influence des facteurs de transcription pro-différenciation sur l'expression des marqueurs de cellules souches/progénitrices intestinales

à la famille des polycombs, se retrouve en amont de ces 3 facteurs de transcription dans la cascade de différenciation entérocytaire puisqu'il n'est pas affecté.

3.10 Rôle du polycomb Bmi-1 dans l'homéostasie des cellules cryptales HIEC

Comme mentionné précédemment, le polycomb Bmi-1 a été identifié comme un marqueur spécifique des cellules souches intestinales en position +4. De plus, ce facteur est connu pour sa capacité à prévenir la sénescence cellulaire en réprimant le locus *INK4/ARF*. Les premières études de caractérisation des HIEC ont montré leur aptitude à perdurer en culture jusqu'à 30 passages avant d'entrer en sénescence, ce qui est peu commun pour un modèle cellulaire issu d'une culture primaire. Les expériences d'incorporation de BrdU ont démontré que les HIEC cessent totalement de proliférer lorsqu'elles atteignent la confluence en culture (Figure 16A). Ces mêmes expériences d'incorporation de BrdU ont aussi démontré que même après être restées à confluence pendant une période de 30 jours, les HIEC conservent leur capacité à proliférer. Cette observation suggère ainsi la présence d'un mécanisme de prévention à long terme de l'entrée en sénescence chez les HIEC. Bien que suggéré par les résultats en PCR quantitatif chez les HIEC^{IndHNF1 α /Cdx-2}, les essais en immunofluorescence ont confirmé la présence nucléaire de la protéine Bmi-1 chez les cellules HIEC (Figure 16B).

Figure 16: Implication du polycomb Bmi-1 chez les cellules HIEC

(A) Expériences d'incorporation de BrdU illustrant le pourcentage de cellules en phase S chez les cellules HIEC à sous-confluence (SC), à 30 jours post confluence (PC + 30) et chez des cultures ayant subi 3 passages successifs après avoir été conservées à post-confluence pendant 30 jours (PC + 30 + 3 pass). (B) Immunofluorescences démontrant la localisation nucléaire de Bmi-1 (panneau de gauche) chez les cellules HIEC. Les noyaux ont été colorés au DAPI (panneau de droite). (C) Analyses en PCR quantitatif représentant les variations d'expression des messagers de Bmi-1 et p16^{INK4a} chez des cultures de HIEC à passage #30 comparativement aux HIEC à passage #16. Une diminution du messager de Bmi-1 chez les HIEC à passage #30 est accompagnée d'une augmentation des niveaux du messager de p16^{INK4a}, comparativement aux HIEC à passage #16. (n =2) (D) Analyses en PCR quantitatif révélant une modulation de l'expression du messager de Bmi-1 en fonction du stade de post-confluence chez les cellules HIEC (n = 2).

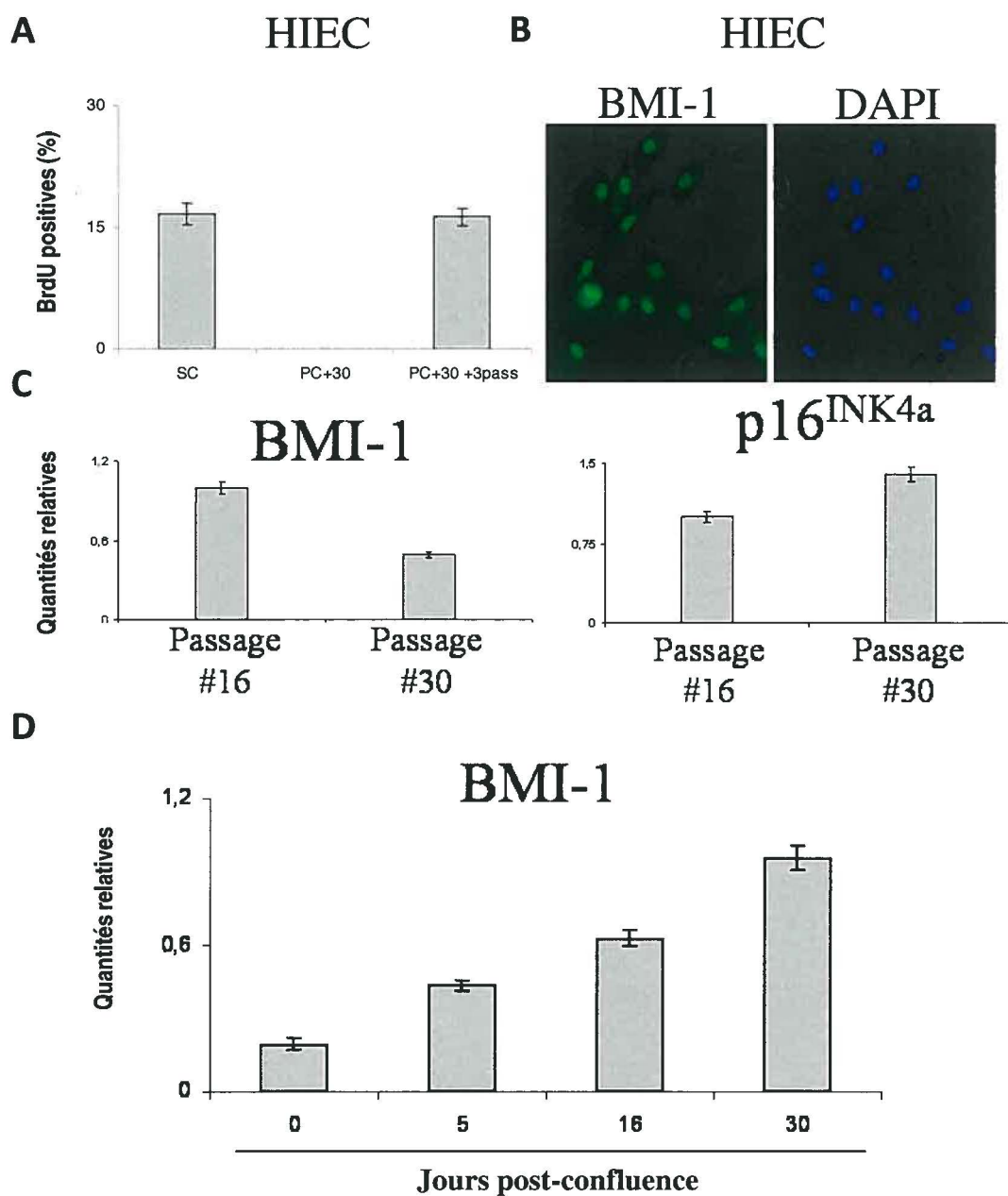


Figure-16: Implication du polycomb Bmi-1 chez les cellules HIEC

De plus, la comparaison des niveaux d'expression du messenger de Bmi-1 entre de jeunes cultures de HIEC (passage 16) et des cultures sénescents (passage 30) dévoile une baisse d'expression de Bmi-1 en fonction de «l'âge» des cellules. Du même coup, cette diminution de l'expression de Bmi-1 est corrélée avec une augmentation des niveaux du messenger de p16^{INK4a}, un inhibiteur de cycle cellulaire reconnu pour être lié à la sénescence et encodé par un gène du locus *INK/ARF* (Figure 16C). Des expériences en PCR quantitatif faites sur de jeunes cultures de HIEC, soit entre les passages 16 et 20, ont aussi révélé que les niveaux d'expression du messenger de Bmi-1 augmentaient en fonction de la période post-confluente (Figure 16D). Ces observations suggèrent une participation du polycomb Bmi-1 dans un mécanisme de prévention de la sénescence chez les HIEC, dans la mesure où les cellules post-confluentes nécessitent une forte expression de Bmi-1 afin de conserver leur potentiel prolifératif.

3.11 Caractérisation de l'expression du polycomb SUZ12 au niveau de la muqueuse intestinale humaine

Tout comme dans le cas de Bmi-1, l'expression du polycomb SUZ12 a été largement caractérisée chez les cellules souches embryonnaires et hématopoïétiques ainsi que dans certains types de cancers (Aldiri et Vetter, 2009; Glinsky, 2008; Majewski et al., 2008; Pizzatti et al.). Cependant, à part son expression rapportée dans la lignée cancéreuse de colon SW480, rien n'est présentement connu concernant l'expression et la distribution de SUZ12 dans les

cellules intestinales (Kirmizis et al., 2004). Des essais en immunofluorescence sur des sections d'iléons fœtaux et adultes humains ont exposé la présence de la protéine SUZ12 dans les noyaux des cellules épithéliales de la crypte (Figure 17A, B). Au niveau du colon adulte, SUZ12 est exprimé exclusivement au fond des glandes. Toutefois, dans l'intestin grêle adulte, l'expression de SUZ12 est restreinte aux cellules n'étant pas terminalement différenciées soit la région médiane de la crypte. SUZ12 est absent des cellules différenciées de la villosité (sucrase-isomaltase positives; Figure 17D, E) et de la crypte (cellules de Paneth au fond de la crypte; Figure 17D, E). La position des cellules de Paneth a été mise en évidence par le marqueur spécifique PLAG2A (Figure 17F) (Murayama et al., 2009). L'expression de SUZ12 a ensuite été étudiée par immunobuvardage dans différents modèles cellulaires utilisés pour récapituler les différentes régions fonctionnelles de l'axe crypte-villosité. Les cellules épithéliales indifférenciées ainsi que les Caco-2/15 aux stades jeunes de confluence ont démontré une forte expression de la protéine SUZ12 (Figure 17G). Les cellules thermosensibles TsFHI sont reconnues pour avoir un phénotype typique aux cellules du fond de la crypte, soit prolifératif et indifférencié, lorsqu'elles sont cultivées à 32°C. Alors que leur transfert à 39°C les amène à entreprendre un programme de différenciation.

Figure 17: Expression du polycomb SUZ12 au niveau de la muqueuse intestinale humaine

Immunofluorescences effectuées sur des coupes cryogéniques d'iléon et de colon adultes ainsi que d'iléon fœtal de 18-20 semaines de gestation. La présence nucléaire de SUZ12 (vert) est détectée au niveau des cellules épithéliales de la crypte de l'intestin grêle fœtal (A et B) de même qu'au fond des structures glandulaires du colon adulte (C). Chez l'iléon adulte, SUZ12 est retrouvé dans les noyaux des cellules indifférenciées (vert) tandis que les cellules démontrant un marquage pour la sucrase-isomaltase mature (rouge) sont SUZ12-négatives (D et E). Des observations à fort grossissement révèlent l'absence de SUZ12 chez certaines cellules à la base des cryptes (E), tel qu'observé chez les cellules différenciées de la villosité. Cette position cryptale est occupée par les cellules de Paneth, qui sont mises en évidence par la détection de PLA2G2A (vert) (F). Les noyaux cellulaires ont été colorés au DAPI. (G) Expériences en Immunobuvardage démontrant l'expression protéique de SUZ12 chez différentes lignées cellulaires intestinales humaines. Les cellules Caco-2/15 ont été analysées aux stades sous-confluent (sc) ainsi qu'à 0, 5 et 8 jours post-confluence (+0, +5, +8). L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation.

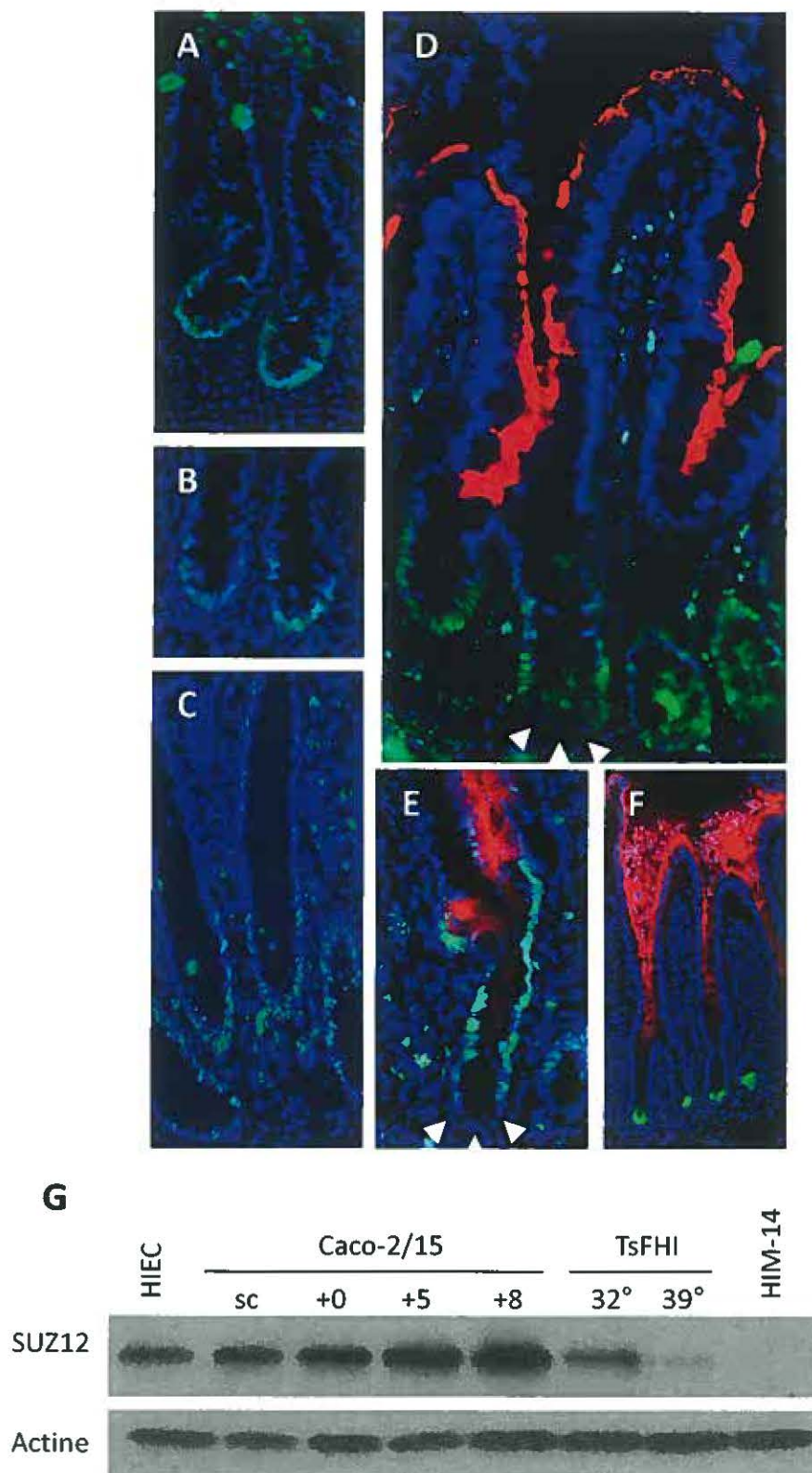


Figure-17: Expression du polycomb SUZ12 au niveau de la muqueuse intestinale humaine

En ce sens, des niveaux plus élevés de SUZ12 ont été détecté chez les TsFHI cultivées à 32°C que dans les cultures différenciées à 39°C (Figure 17G). Finalement, les cellules intestinales myofibroblastiques humaines de la lignée HIM-14 n'ont présenté aucune expression du facteur polycomb SUZ12. Ces résultats démontrent que SUZ12 est exprimé à des niveaux élevés chez les cellules épithéliales de l'intestin humain dont la différenciation est encore incomplète.

3.12 L'abolition de l'expression du polycomb SUZ12 influence la prolifération et l'état de différenciation des cellules HIEC

Dans le but d'identifier l'implication fonctionnelle de la protéine SUZ12 et de la machinerie du groupe polycomb dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal humain, nous avons utilisé un shRNA spécifique au messager de SUZ12 afin d'en inhiber l'expression chez les cellules HIEC. Tel que démontré précédemment, ce modèle normal présente à priori certaines caractéristiques des cellules souches intestinales comme l'expression de Bmi-1 et DcamKL1 en plus de pouvoir entreprendre un processus de différenciation entérocytaire suivant l'expression ectopique des facteurs Cdx-2 et HNF1 α . Des essais d'immunobuvardage nous ont confirmé une disparition quasi-totale de la protéine SUZ12 chez les cellules HIEC/shSUZ12 comparativement aux cellules contrôle HIEC/shCNS (Figure 18A). Cette inhibition de l'expression de SUZ12 est aussi accompagnée par une baisse de la tri-méthylation de la lysine 27 de

l'histone H3, qui constitue une marque absolue de l'activité du complexe PRC2 dont fait partie SUZ12. De plus, des expériences d'incorporation de BrdU ont démontré une réduction massive du nombre de cellules en phase S chez les HIEC/shSUZ12 comparativement aux contrôles HIEC/shCNS (Figure 18B). Cette observation vient appuyer le fait que la machinerie polycomb joue un rôle important dans le maintien du potentiel prolifératif des cellules HIEC. Considérant la complémentarité frappante entre le patron d'expression de SUZ12 et la présence optimale de la sucrase-isomaltase à travers l'axe crypte-villosité, nous avons évalué l'impact de l'invalidation de SUZ12 au niveau de la maturation des HIEC ayant entrepris leur processus de différenciation entérocytaire. Les enzymes de la bordure en brosse dont la sucrase-isomaltase et la dipeptidyl peptidase-IV sont reconnues comme des marqueurs de la différenciation fonctionnelle des cellules entérocytaires humaines. Des expériences en PCR quantitatifs ont d'abord démontré que l'abolition de l'expression de SUZ12 chez les HIEC de type sauvage n'entraînait aucune induction significative de l'expression de la sucrase-isomaltase et de la DPPIV. Toutefois, nous avons démontré auparavant la capacité de Cdx-2 et HNF1 α à induire l'expression de ces deux marqueurs de différenciation. En abolissant l'expression de SUZ12 chez les cellules HIEC déjà activées pour entamer un processus de différenciation entérocytaire, nous avons observé des augmentations de 400% et 50% dans les niveaux d'expressions de la sucrase-isomaltase et de DPPIV, respectivement (Figure 18C, D).

Figure 18: L'abolition de l'expression de SUZ12 affecte la prolifération et l'expression de marqueurs de différenciation chez les HIEC

(A) L'abolition de l'expression de SUZ12 par shRNA, ainsi que son effet au niveau de la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 ont été confirmés par immunobuvardage chez les cellules HIEC/shSUZ12 comparativement aux HIEC/shCNS. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. (B) Expériences d'incorporation de BrdU faites chez les cellules HIEC/shCNS et HIEC/shSUZ12. L'histogramme démontre le ratio du nombre de cellules BrdU-positives par rapport au nombre total de cellules (DAPI) pour chaque condition (n=3, **: $p \leq 0,01$). Des analyses en PCR quantitatif illustrent les différences d'expression des messagers de la sucrase-isomaltase (C) et de la DPPIV (D) chez les cellules HIEC wt shCNS et shSUZ12, ainsi que chez les HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} + dox shCNS et shSUZ12. L'abolition de SUZ12 entraîne des augmentations significatives d'environ 400% et 50% de l'expression des messagers de la sucrase-isomaltase et de DPPIV respectivement chez les cellules HIEC^{indHNF1 α /Cdx-2} + dox, comparativement aux HIEC/shCNS exprimant Cdx-2 et HNF1 α (n=3, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,0001$).

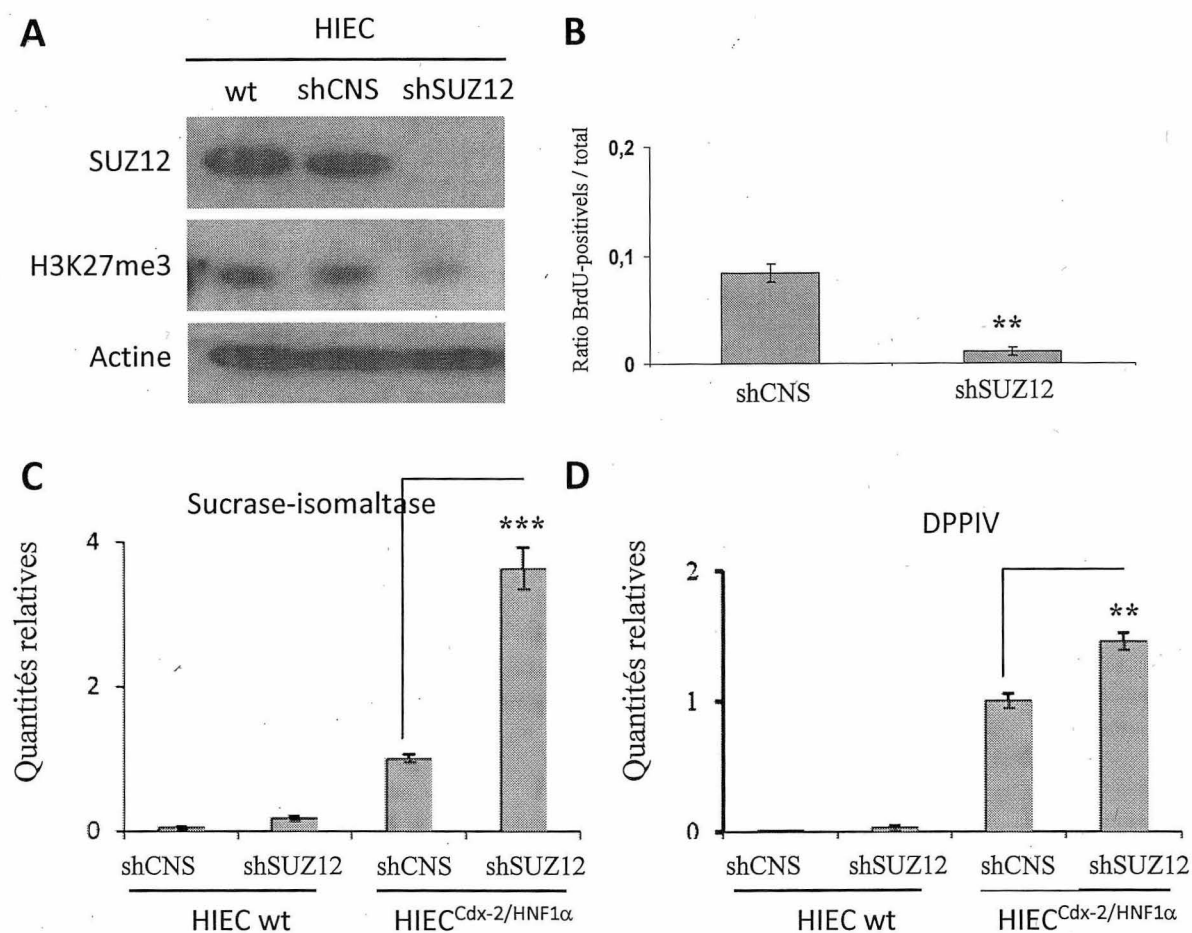


Figure-18: L'abolition de l'expression de SUZ12 affecte la prolifération et l'expression de marqueurs de différenciation chez les HIEC

3.13 L'abolition de SUZ12 accélère le programme de différenciation des cellules Caco-2/15

Les cellules Caco-2/15 constituent l'un des modèles de différenciation entérocytaire les mieux caractérisés dans la littérature. À l'aide d'un shRNA entraînant la dégradation du messenger de SUZ12, nous avons voulu confirmer que l'effet pro-différenciation retrouvé chez les HIEC, suite à l'invalidation de la machinerie polycomb, était aussi observé dans la lignée cellulaire Caco-2/15. D'une part, des analyses en immunobuvardage ont confirmé une diminution des quantités de la protéine SUZ12 et de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 aux stades 0, 5 et 8 jours post-confluence chez les Caco-2/15/shSUZ12 comparativement aux cellules contrôles (Figure 19A). Dans ce même contexte, nous avons démontré que les niveaux d'expression de la sucrase-isomaltase étaient significativement augmentés aux stades 5 et 8 jours post-confluence chez les cellules Caco-2/15/shSUZ12 comparativement aux cellules Caco-2/15/shCNS (Figure 19A, B). De tels résultats suggèrent que la perte de fonctionnalité de la machinerie polycomb chez les cellules Caco-2/15 entraîne une exécution prématurée de leur programme de différenciation entérocytaire.

Figure 19: SUZ12 réprime le programme de différenciation entérocytaire chez les cellules Caco-2/15

(A) L'abolition de l'expression de SUZ12 par shRNA, ainsi que son effet au niveau de la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 ont été confirmé par immunobuvardage chez les cellules Caco-2/15/shSUZ12 +0, +5 et +8 jours post-confluence, comparativement aux cellules Caco-2/15/shCNS de mêmes stades. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. De plus, l'expression protéique de la sucrase isomaltase a été analysée, dans ces mêmes conditions, aux stades +0, +5 et +8 jours post-confluence (P.C.). (B) Analyses densitométriques des niveaux d'expression de la sucrase-isomaltase observés en immunobuvardage chez les cellules Caco-2/15/shCNS et shSUZ12 (n=3, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$).

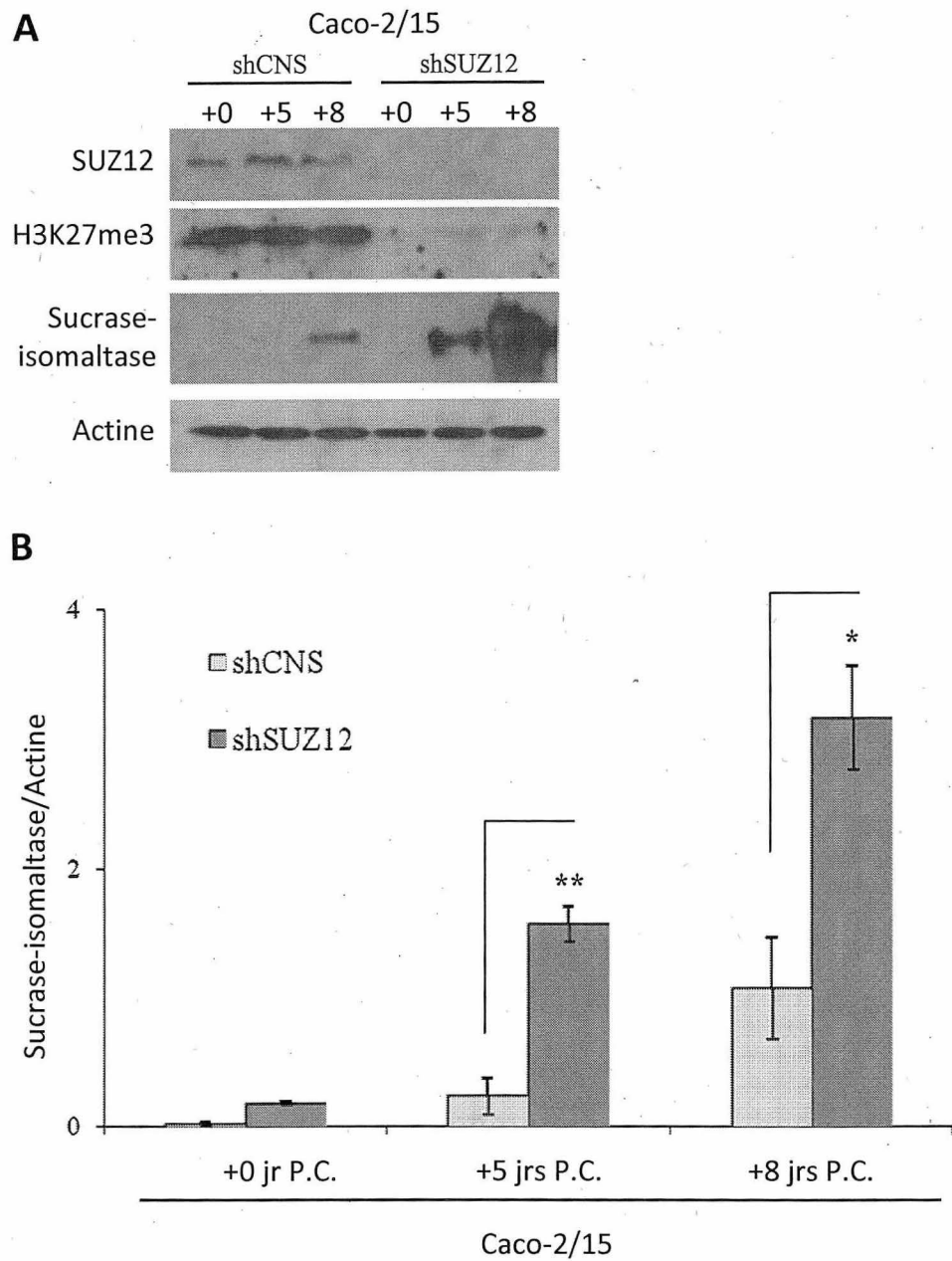


Figure-19: SUZ12 réprime le programme de différenciation entérocytaire chez les cellules Caco-2/15

3.14 Analyse du profil d'expression génétique des cellules HIEC^{IndHNF1α/Cdx-2} suivant l'altération de la machinerie polycomb

Des expériences de micropuces à ADN ont permis d'approfondir nos études sur l'impact de l'invalidation de SUZ12 chez les HIEC exprimant les facteurs Cdx-2 et HNF1α en combinaison. Nous avons comparé les profils d'expression génétique des cellules HIEC^{IndHNF1α/Cdx-2} induites + shSUZ12 avec les cellules HIEC^{IndHNF1α/Cdx-2} induites + shCNS. Parmi les 19 200 clones d'ADNc présents sur les micropuces, 1470 d'entre eux ont démontrés une modulation significative de leur expression et ont pu être inclus dans les études ontologiques. Au total, 383 gènes appartenant à diverses catégories fonctionnelles ont été démontré comme étant modulés en absence de SUZ12. L'observation des cartes de regroupement de gènes, où la couleur verte signifie une sous-expression et la couleur rouge correspond à une surexpression, démontre une distinction claire entre les profils d'expression (Figure 20A). Il est intéressant de noter que parmi les 383 gènes modulés de façon significative par l'invalidation de SUZ12 chez les HIEC^{IndHNF1α/Cdx-2} induites, plus de 25% d'entre eux sont associés à la différenciation cellulaire (98 gènes) (Figure 20B). Les catégories «voies métaboliques» (81 gènes), «cancer» (32 gènes) et «ribosomes» (30 gènes), sont aussi grandement affectées par l'abolition de SUZ12 (Figure 20B). Considérant les différences d'expression observées dans les marqueurs de différenciation entérocytaire en l'absence de SUZ12, nous avons porté une attention particulière aux gènes inclus dans la catégorie «Différenciation cellulaire» (Tableau 6). Du

nombre, on retrouve les marqueurs de cellules souches CD24 et CD44 qui subissent une répression importante suite à l'abolition de SUZ12. Par ailleurs, l'expression de la furine est augmentée d'environ 4 fois suite à l'abolition de SUZ12. Une portion des gènes modulés par l'absence de SUZ12 chez les HIEC et associés à la différenciation cellulaire est représentée à la Tableau-6.

Tableau-6: Gènes associés à la différenciation cellulaire et modulés significativement suite à l'abolition de SUZ12 chez les HIEC^{indHNF1α/Cdx-2} induites

HIEC ^{indHNF1α/Cdx-2} + dox shSUZ12 vs shCNS		
Gène	Fonction/différenciation	Variation
CD24	Marqueur de cellules souches	↓ 6,25x
CD44	Marqueur de cellules souches	↓ 7,14x
p300	Co-répresseur transcriptionnel	↓ 3,23x
EphA4	Morphogenèse de la crypte intestinale foetale	↓ 3,03x
EphA5	Indéetectable dans l'intestin grêle murin	↑ 2,15x
REST	Répresseur de la différenciation neuronale	↓ 3,33x
Smad3	Transduction de signaux de la voie TGFβ	↓ 4,55x
HoxD10	Différenciation des neurones moteurs	↓ 2,86x
SOX-9	Répresseur de Cdx-2 et Muc2	↓ 2,33x
Swi/Snf-related SMARCE1	Remodelage nucléosomal	↓ 3,23x
TGIF1	Inhibition de la voie TGFβ	↓ 2,33x
Calreticuline	Différenciation mucineuse (cancer du colon)	↑ 2,48x
CXCR4	Intégrité de la barrière épithéliale	↑ 1,60x
p18	Inhibiteur de la croissance cellulaire	↑ 2,82x
Fibronectine	Homéostasie de la crypte intestinale	↓ 18,73x
Netrine 4	Réprimé dans la différenciation des cellules neurales	↓ 2,27x
RhoA	Réprimé dans la différenciation des cellules HT-29	↓ 6,25x
HDAC5	Remodelage de la chromatine	↓ 5,00x
Furine	Augmenté lors de la différenciation entérocytaire	↑ 3,82x
RNF44	Régulation de l'ubiquitinylation	↓ 2,63x
RNF114	Régulation de l'ubiquitinylation	↓ 6,25x
RNF149	Fonction inconnue	↓ 6,25x
PCGF1	Ubiquitinylation de l'histone H2A	↓ 2,08x
Zinc finger protein 488	Fonction inconnue	↓ 3,03x
DUSP3	Contribue à la différenciation par les voies Erk et JNK	↑ 6,69x

Figure 20: Analyse comparative des profils d'expression génétique des cellules HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1 α en présence et en absence de SUZ12

(A) Représentation colorimétrique des patrons d'expression observés suite à des analyses par micropuces à ADN faites à partir d'échantillons d'ADNc de HIEC^{indCdx-2/HNF1 α} induites + shCNS et shSUZ12. Pour les 19 200 gènes représentés sur chaque micropuce, le vert représente un état sous-exprimé tandis que le rouge correspond à une surexpression. (B) Les différents gènes significativement modulés (à la hausse ou à la baisse) en réponse à l'abolition de SUZ12 chez les HIEC^{indCdx-2/HNF1 α} induites, comparativement aux cellules contrôles HIEC^{indCdx-2/HNF1 α} induites + shCNS, ont été classés selon les différents processus biologiques auxquels ils sont principalement associés ($p \leq 0,05$).

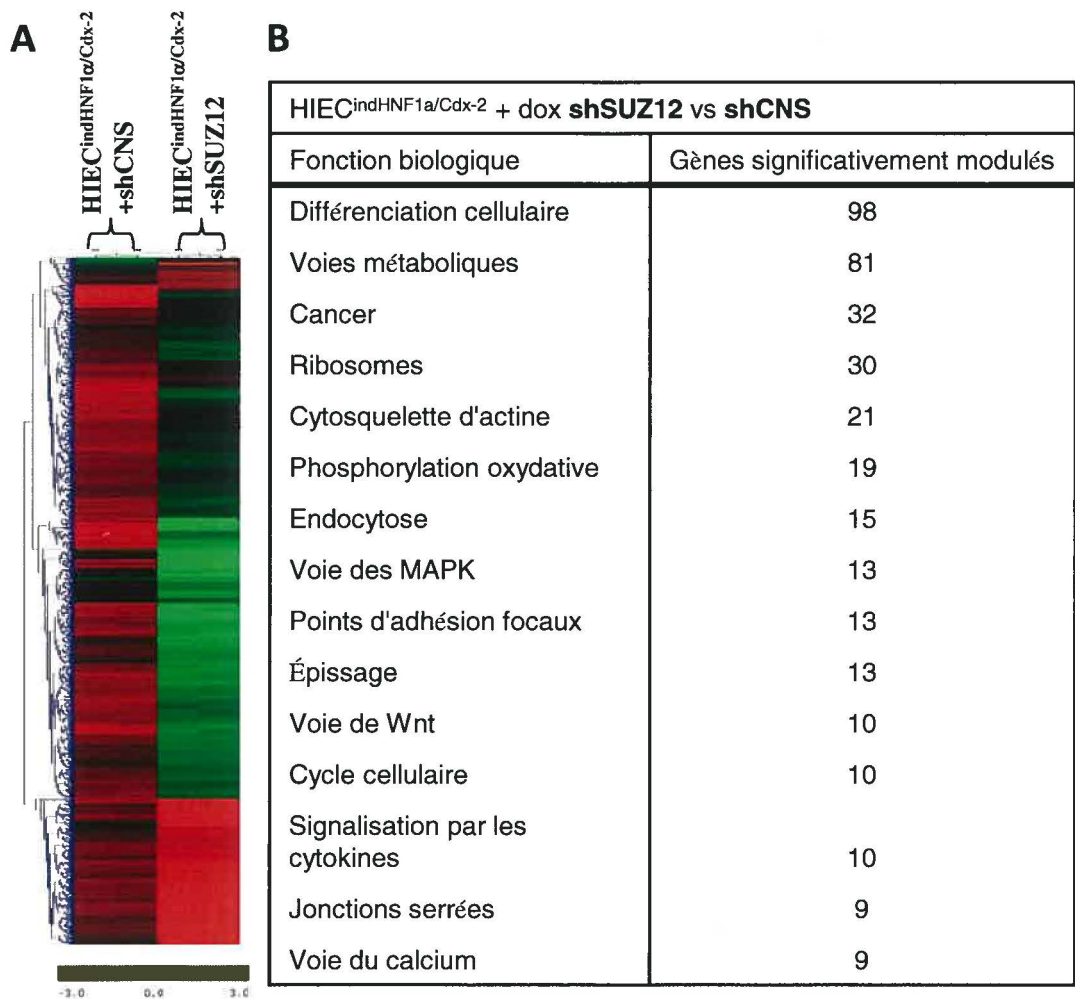


Figure-20: Analyse comparative des profils d'expression génétique des cellules HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1 α en présence et en absence de SUZ12

3.15 Variation des profils d'expression des récepteurs intégrines suite à l'induction de la différenciation entérocytaire

Des données obtenues lors de la comparaison, par micropuces à ADN, des profils d'expression génétique des cellules HIEC de type sauvage par rapport aux HIEC exprimant les facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 ont permis d'observer certaines modulations intéressantes au niveau des récepteurs intégrines. En effet, les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$, qui sont normalement associées aux cellules cryptales indifférenciées (Beaulieu et al., 1992) et présentes chez les cellules HIEC (Auclair, 2005; Morin, 2009), subissent une baisse d'expression de l'ordre de 2,28 et 1,86 fois respectivement suite à l'initiation de la différenciation entérocytaire chez les HIEC (Figure 21A). Conséquemment, l'expression du gène encodant la sous-unité intégrine $\alpha 3$, dont la présence est associée à l'épithélium intestinal différencié (Beaulieu, 1997; Beaulieu et al., 1992; Gout et al., 2001), est augmentée de 2 fois chez les cellules HIEC en différenciation par rapport aux HIEC de type sauvage (Figure 21A). Ces expériences ont aussi permis de démontrer que l'expression du gène encodant la sous-unité intégrine $\alpha 8$ subissait une diminution de 2,65 fois suite à l'initiation de la différenciation entérocytaire chez les HIEC (Figure 21A). Les observations concernant la sous-unité $\alpha 8$ ont été confirmées par des essais en RT-PCR où une réduction drastique des niveaux de messager de $\alpha 8$ a été démontrée en présence des facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 (Figure 21B). Selon la littérature, la sous-unité intégrine $\alpha 8$ peut s'associer uniquement à la sous-unité $\beta 1$ afin de former

Figure 21: Variation des niveaux d'expression des sous-unités intégrines suite à l'induction du processus de différenciation entérocytaire chez les HIEC

(A) Données issues d'expériences de micropuces à ADN et démontrant la variation des niveaux d'expression des messagers encodant les sous-unités intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 8$ chez les HIEC^{indCdx-2/HNF1 α} + GATA-4 + dox comparativement aux cellules HIEC de type sauvage. (B) Analyses RT-PCR représentatives de l'expression du messenger de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ chez les HIEC exprimant les facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 selon diverses combinaisons. L'expression de RPLP0 a été analysée comme contrôle de normalisation.

A

HIEC HNF-1 α /Cdx-2/GATA-4 vs HIEC wt

Gène	Variation
ITGA1	Baisse 2,28x
ITGA2	Baisse 1,86x
ITGA3	Hausse 2,00x
ITGA8	Baisse 2,65x

B



Cdx-2	-	+	-	+
HNF1 α	-	+	-	+
GATA-4	-	-	+	+
Int α 8				
RPLP0				

Figure-21: Variation des niveaux d'expression des sous-unités intégrines suite à l'induction du processus de différenciation entérocytaire chez les HIEC

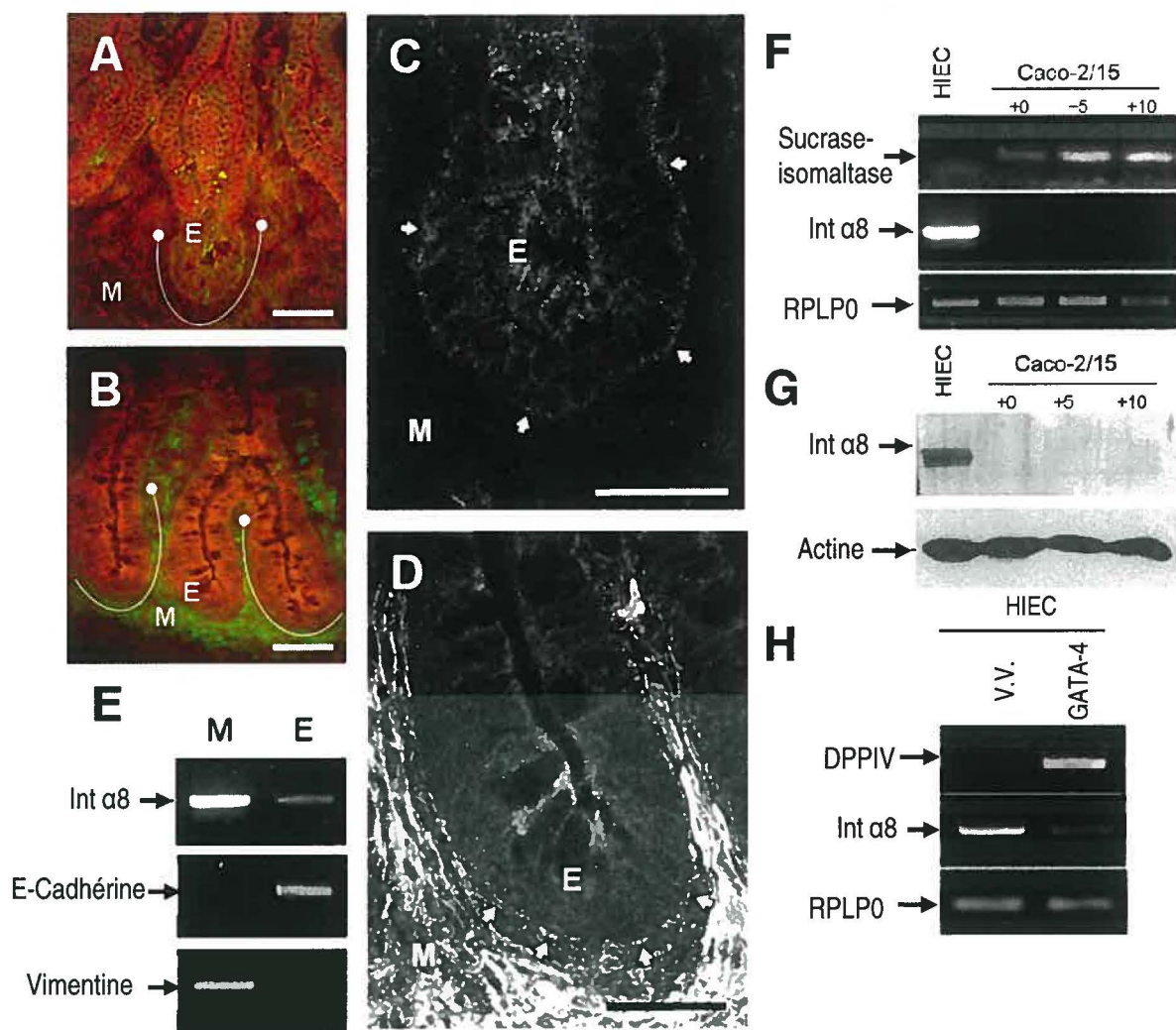
l'hétérodimère intégrine $\alpha 8 \beta 1$ (Bossy et al., 1991). Jusqu'ici, très peu d'informations sont disponibles quant à la présence et la participation de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ dans la régulation de quelconque fonction cellulaire intestinale.

3.16 Caractérisation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ au niveau de l'épithélium intestinal humain

Afin d'investiguer plus en profondeur la participation potentielle de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ dans le maintien de l'homéostasie cryptale, nous avons d'abord analysé le patron d'expression de la sous-unité $\alpha 8$ au sein d'iléon fœtaux humains aux stades 14 et 20 semaines de gestation. D'une part, des observations faites en immunofluorescence ont permis de démontrer la présence de $\alpha 8$ à la base des cellules épithéliales de la zone proliférative dans les espaces intervillositaires chez les spécimens de 14 semaines (Figure 22A, C). À 20 semaines de gestation, le marquage correspondant à la présence de $\alpha 8$ continu d'être observé à la base de certaines cellules épithéliales des compartiments cryptaux nouvellement formés. Cependant, à ce stade, une forte expression de $\alpha 8$ est aussi notée au niveau du stroma (Figure 22B, D). La présence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ chez les cellules épithéliales intestinales humaines a ensuite été confirmée par des RT-PCR faits sur des échantillons d'ADNc obtenus à partir de fractions épithéliales et mésenchymateuses pures de jéjunum fœtaux de 20 semaines (Figure 22E). Tel qu'attendu, une forte présence du messager encodant $\alpha 8$ a été détecté dans les fractions mésenchymateuses. La pureté de ces fractions a été confirmée par

Figure 22: Caractérisation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ au niveau de l'épithélium intestinal humain

Immunofluorescences représentatives de la localisation de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ au niveau de coupes cryogéniques d'iléons fœtaux humains de 14 (A et C) et 20 (B et D) semaines de gestation. Les régions cryptales sont définies par les traits blancs en A et B. Les cryptes prises à fort grossissement démontrent une présence basolatérale de $\alpha 8$ (flèches) chez les cellules épithéliales (E) localisées au fond des cryptes, autant au stade 14 semaines qu'à 20 semaines de gestation (C et D). Notons qu'à 20 semaines la présence de $\alpha 8$ est beaucoup plus intense dans la région mésenchymateuse (M) (Barres=50 μm pour A et B, 25 μm pour C et D). (E) RT-PCR représentatifs de la présence du messenger de $\alpha 8$ au niveau des fractions épithéliales (E) et mésenchymateuses (M) de d'iléons fœtaux humains de 18-20 semaines de gestation. La pureté des fractions a été validée par l'absence respective de vimentine et de E-cadhérine. (F) RT-PCR représentatifs de l'expression du messenger de $\alpha 8$ chez les cellules HIEC et Caco-2/15 (+0, +5 et +10 jours post-confluence). La détection du messenger de la sucrase-isomaltase fait foi du niveau de différenciation des conditions analysées. L'expression de RPLP0 a été analysée comme contrôle de normalisation. (G) Immunobuvardage confirmant l'expression protéique de $\alpha 8$ chez les HIEC. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. (H) RT-PCR représentatif de l'expression du messenger de $\alpha 8$ chez les HIEC/GATA-4, comparativement aux contrôles vecteur vide (v.v.). DPPIV est utilisé comme marqueur de différenciation tandis que RPLP0 est utilisé comme contrôle de normalisation.



Tiré de Benoit & al., Biology of the Cell. 2009

Figure-22: Caractérisation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ au niveau de l'épithélium intestinal humain

l'absence de E-cadhérine et de vimentine dans les fractions épithéliales et mésenchymateuses respectivement. L'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 8$ a ensuite été analysée par RT-PCR et par immunobuvardage chez les modèles cellulaires HIEC et Caco-2/15. Autant au niveau de la protéine que du messenger, aucune expression de $\alpha 8$ n'a été observée chez les cellules Caco-2/15, peu importe le stade de confluence. Toutefois, une forte expression du messenger et de la protéine $\alpha 8$ a été observée chez les cellules HIEC (Figure 22F, G). Afin de démontrer l'association entre l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ et le phénotype cryptal, nous avons montré que la surexpression du facteur de transcription pro-différenciation GATA-4 induit clairement une baisse d'expression du messenger de $\alpha 8$ tout en induisant l'expression du marqueur de différenciation DPPIV chez les HIEC (Figure 22H). Ensemble, ces résultats exposent l'expression spécifique de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ par les cellules progénitrices de l'épithélium intestinal humain. De plus, le modèle cellulaire HIEC sera subséquentement utilisé afin de comprendre l'implication fonctionnelle de cette intégrine au niveau de la crypte intestinale humaine.

3.17 Rôle de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ au niveau de l'adhésion cellulaire, de l'organisation des points d'adhésion focaux et de l'assemblage des fibres de stress

Les propriétés adhésives de type RGD dépendantes, chez les cellules HIEC, ont été évaluées par des essais d'adhésion faisant intervenir une matrice synthétique constituée d'un peptide de fusion GST appelé TNfn3, qui contient en fait la 3^e

répétition fibronectine de type III de la tenascine-C. Ce module structural d'environ 90 acides aminés, initialement identifié à l'intérieur de la séquence peptidique de la fibronectine, comprend un motif RGD qui sert de site de liaison pour certaines intégrines (Geiger et al., 2001). Les cellules HIEC de type sauvage ont démontré une adhésion très efficace sur un tel peptide. Toutefois, l'utilisation d'un anticorps bloquant la sous-unité intégrine $\beta 1$ a complètement aboli l'adhésion RGD dépendante des HIEC sur le TNfn3 (Figure 23A). D'autre part, les tests d'adhésions effectués en présence d'un anticorps neutralisant la sous-unité intégrine αV ont démontré une réduction de l'adhésion cellulaire d'environ 50% chez les HIEC. À l'opposée, l'utilisation d'anticorps neutralisant les sous-unités intégrine $\alpha 5$ et $\alpha 9$ n'a pas influencé de manière significative l'adhésion RGD dépendante des cellules HIEC (Figure 23A). Ainsi, par élimination, ces résultats suggèrent l'implication d'une autre intégrine $\beta 1$ dans l'adhésion de type RGD dépendante chez les HIEC. Dans ce cas, l'implication de $\alpha 8\beta 1$ s'avère une possibilité mais l'inexistence d'anticorps neutralisant la sous-unité $\alpha 8$ nous a empêchés d'en faire la preuve. Nous avons donc opté pour l'établissement d'une lignée HIEC dans laquelle l'expression de $\alpha 8$ est spécifiquement inhibée par la présence d'un shRNA. Des analyses en immunobuvardage ont permis de confirmer la réduction d'environ 70% des niveaux d'expression de $\alpha 8$ chez les cellules HIEC/sh $\alpha 8$ comparativement aux HIEC/shCNS et HIEC de type sauvage (Figure 23B, C). De plus, nous avons démontré que l'action des shRNA contrôle (CNS) et $\alpha 8$ n'influçait pas l'expression des sous-unités intégrines αV et $\beta 1$ comparativement aux HIEC de type sauvage (Figure 23B, C). Nous avons ensuite

effectué des essais d'adhésion, impliquant les cellules HIEC/shCNS et HIEC/sh α 8, sur une matrice de TNfn3 pour démontrer que l'absence de l'intégrine α 8 β 1 réduisait les niveaux d'adhésion d'environ 70% comparativement aux conditions contrôle (Figure 23D). Notons que ces mêmes essais effectués sur une matrice de TNfn3 comportant une mutation du site RGD en séquence RAA, ont conduit à des niveaux d'adhésion négligeables chez les cellules HIEC/shCNS et HIEC/sh α 8. Le résultat de ces expériences assure l'importance de la contribution de l'intégrine α 8 β 1 dans l'adhésion de type RGD dépendante chez les cellules épithéliales intestinales de la crypte.

Suite à cette démonstration de l'importance de l'intégrine α 8 β 1 dans l'adhésion des cellules cryptales, nous avons porté notre attention vers l'impact d'une inhibition de l'expression de cette intégrine sur l'organisation des points d'adhésion focaux et du cytosquelette d'actine. Pour se faire, nous avons ensemencé contrôles et HIEC/sh α 8 sur des lamelles de verre enduites de sérum puis analysé, par immunofluorescence, la distribution de la vinculine qui constitue un marqueur bien caractérisé des points d'adhésion focaux. De plus, les fibres de stress d'actine ont été mises en évidence par l'incubation des cellules avec de la phalloïdine couplée à la rhodamine. La diminution des niveaux d'intégrine α 8 β 1 entraîne une diminution du nombre de points d'adhésion focaux vinculine-positifs ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette d'actine, passant de fibres de stress parallèlement organisées vers un arrangement plutôt cortical (Figure 23E, F). De plus, ces observations s'accompagnent de niveaux d'expression protéique

Figure 23: Influence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ au niveau de l'adhésion cellulaire et de l'organisation du cytosquelette d'actine chez les cellules cryptales

(A) Essais d'adhésion cellulaire (1 heure) impliquant les HIEC de type sauvage ensemencées sur une matrice synthétique de peptide contrôle GST ou de GST-TNfn3 RGD. Les cellules ont été incubées ou non avec différents anticorps neutralisant diverses sous-unités intégrines. Des IgG de souris ont été utilisés comme contrôle négatifs (n=3, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, versus IgG de souris). (B) Détermination des niveaux d'expression des sous-unités $\alpha 8$, αV et $\beta 1$ chez les HIEC de type sauvages, les HIEC/shCNS et les HIEC/sh $\alpha 8$ par immunobuvardage. (C) Quantités relatives des sous-unités intégrines déterminées par des analyses densitométriques faites en fonction de l'expression de la cytokératine-18 (n=3, ***: $p \leq 0,0001$). (D) Essais d'adhésion cellulaire (24 heures) impliquant des HIEC/shCNS ainsi que des HIEC/sh $\alpha 8$ ensemencées sur une matrice synthétique de peptide contrôle GST, de GST-TNfn3 RGD ou de GST-TNfn3 RAA. 10 $\mu\text{g/ml}$ de cycloheximide ont été ajoutés afin de prévenir la sécrétion/déposition de matrice endogène (n=4, ***: $p \leq 0,0001$). La détection de la vinculine (vert) ainsi que la mise en évidence des fibres de stress d'actine par la phalloïdine-rhodamine (rouge) ont été effectuées chez les HIEC/shCNS (E) et les HIEC/sh $\alpha 8$ (F) 24 heures après leur ensemencement (Barre=50 μm). (G) Histogramme illustrant les quantités de points d'adhésion focaux observés par cellule en moyenne chez les HIEC/shCNS et les HIEC/sh $\alpha 8$ (n=8, ***: $p \leq 0,0001$). (H) Expression de la vinculine chez les HIEC/sh $\alpha 8$ comparativement aux HIEC/shCNS. L'actine est utilisée comme contrôle de normalisation.

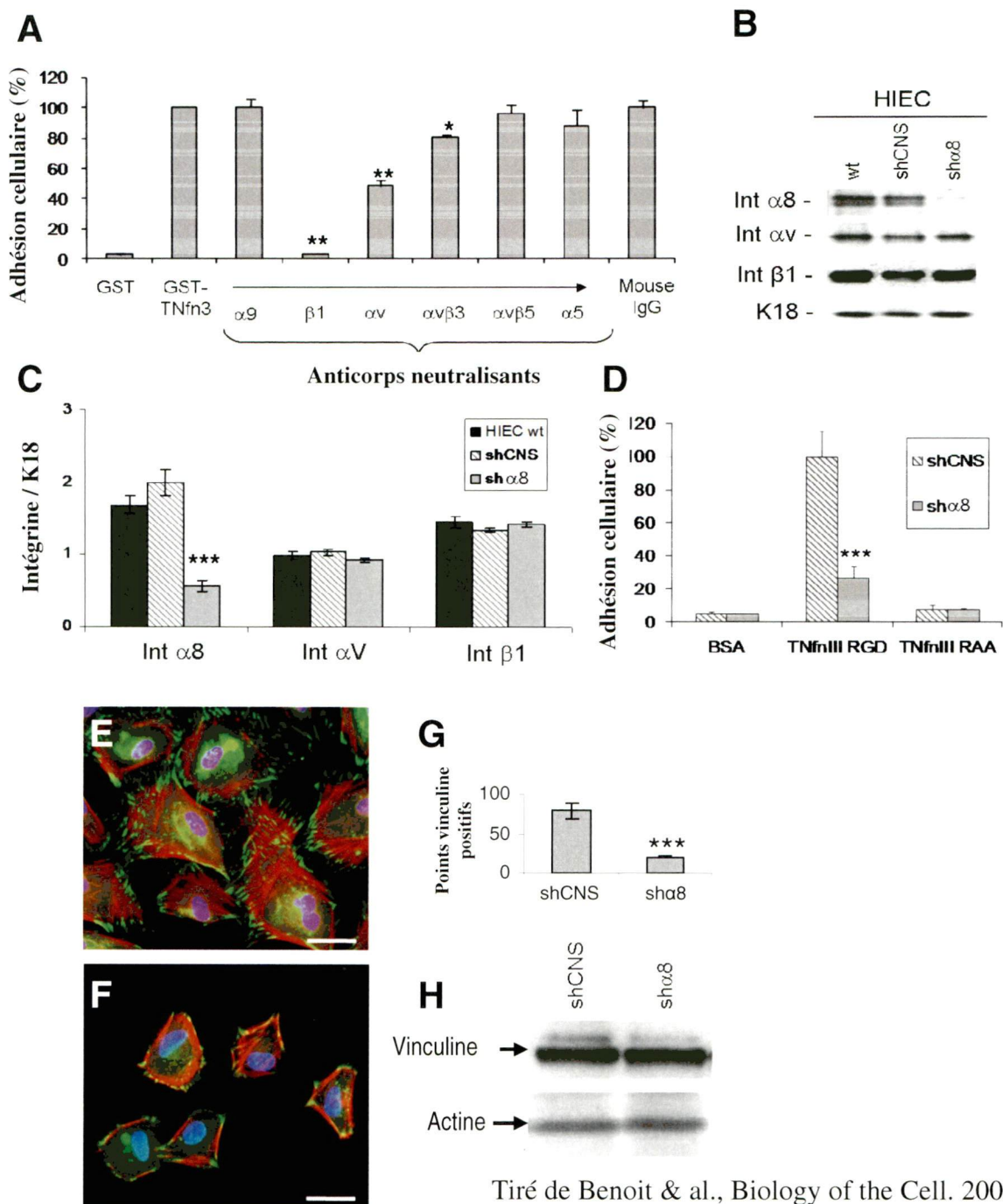


Figure-23: Influence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ au niveau de l'adhésion cellulaire et de l'organisation du cytosquelette d'actine chez les cellules cryptales

inchangés pour la vinculine, chez les HIEC/sh α 8 comparativement aux cellules contrôles (Figure 23G, H).

3.18 L'intégrine α 8 β 1 et l'activation de la GTPase RhoA

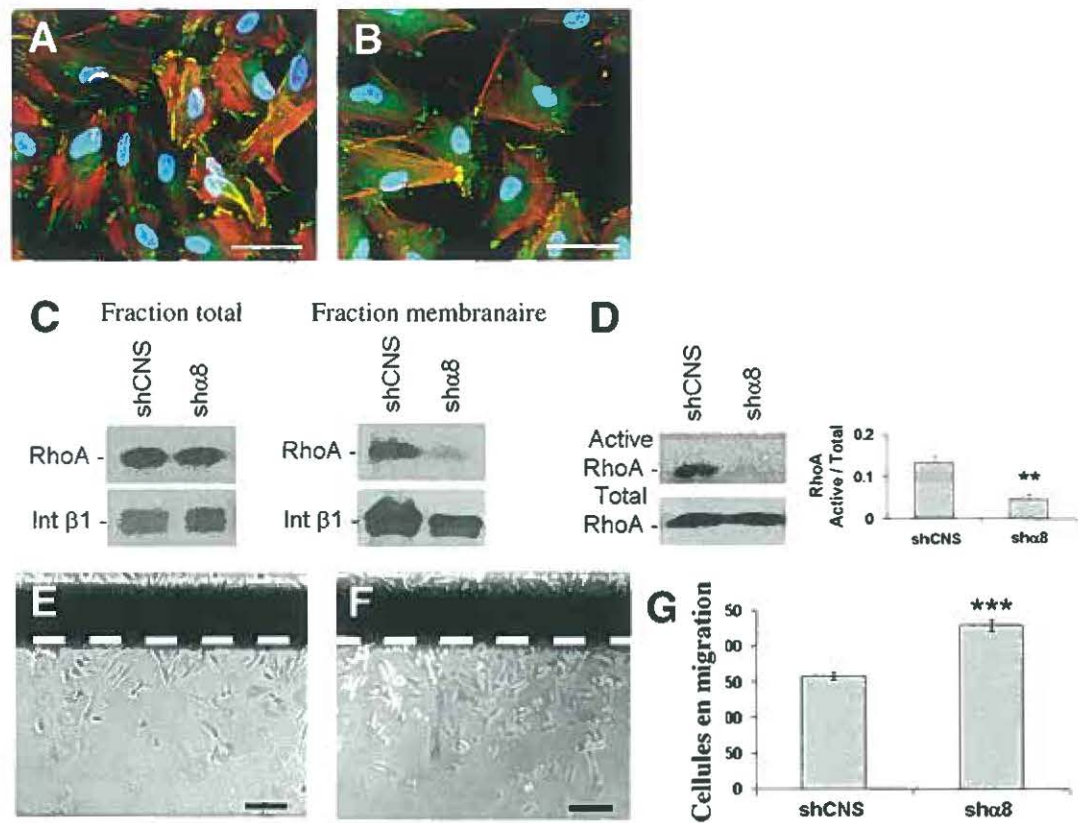
Considérant la relation préalablement établie entre l'intégrine α 8 β 1 l'organisation du cytosquelette d'actine et l'activation et le recrutement à la membrane plasmique de la GTPase RhoA (Zargham et Thibault, 2006; Zargham et al., 2007a; Zargham et al., 2007b), nous avons traité les cellules HIEC avec un inhibiteur pharmacologique de la Rho kinase (ROCK-1/2), soit le Y-27632. La kinase ROCK est considérée comme étant le principal effecteur de la GTPase RhoA active et contribue à la régulation de la croissance cellulaire, de l'assemblage des fibres de stress et du recrutement des composantes des points d'adhésion focaux (Loirand et al., 2006). Le traitement des cellules HIEC de type sauvage avec 20 μ M d'inhibiteur Y-27632, sur une période de 24 heures (Lai et al., 2003), a conduit à l'obtention d'un phénotype similaire à celui observé chez les HIEC/sh α 8 en terme d'organisation du cytosquelette d'actine et de la distribution de la vinculine (Figure 24A, B). Ainsi, nous avons évalué l'activation de la GTPase RhoA chez les HIEC/sh α 8 en analysant la proportion de RhoA se trouvant associée à la membrane plasmique. Concrètement, la localisation membranaire de RhoA est reconnu comme étant un indicateur de son état actif, soit son association avec le GTP (Zargham et al., 2007b). Suite à l'extraction des protéines associées à la membrane, une diminution significative de RhoA

membranaire a été observée chez les HIEC/sh α 8 comparativement aux HIEC/shCNS (Figure 24C). Dans ce contexte, nous avons aussi démontré que les niveaux totaux de RhoA restaient inchangés dans chacune des conditions. Afin de confirmer cette observation, nous avons effectué des essais de «pull-down» de la forme active de RhoA via l'utilisation de billes couplées au domaine de liaison à RhoA de la rhotekine (Cetin et al., 2007). Encore une fois, les HIEC/sh α 8 ont exposé une réduction significative des quantités de RhoA active comparativement aux cellules contrôles (Figure 24D). Il est à noter qu'aucune différence significative des niveaux de Cdc42 et rac1 n'a été observée dans les fractions totales et membranaires chez les cellules HIEC/sh α 8 comparativement aux cellules HIEC/shCNS (voir Benoit & al, 2009 ; suppl.1). Ces observations suggèrent donc que l'intégrine α 8 β 1 occupe un rôle central dans l'activation de la GTPase RhoA chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées.

L'implication fonctionnelle de RhoA dans l'organisation des microfilaments d'actine et, par conséquent, son impact sur la motilité cellulaire a été bien décrite dans la littérature (Hall, 2005). En réalisant des essais de blessure, nous avons démontré une augmentation de 40% du nombre de cellules ayant outrepassé le front de la blessure chez les monocouches de HIEC/sh α 8 par rapport aux HIEC/shCNS (Figure 24E, F, G). Dans ces expériences, la contribution de la prolifération cellulaire a été éliminée dû à l'ajout de 2 mM d'hydroxyurée aux milieux de culture. Ainsi ces essais de blessure confirment que l'abolition de l'intégrine α 8 β 1 stimule la migration des cellules épithéliales intestinales indifférenciées.

Figure 24: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ et l'activation de la GTPase RhoA

Des expériences en immunofluorescence pour la détection de la vinculine (vert) ainsi que la mise en évidence des fibres de stress d'actine par la phalloïdine-rhodamine (rouge) ont été effectuées chez les HIEC sans inhibiteur (A) et les HIEC traitées avec 20 μ M de Y-27632 (B) 24 heures après leur ensemencement (Barre=50 μ m). (C) Immunobuvardages représentatifs de la détection de RhoA dans des extraits protéiques totaux (gauche) et des fractions membranaires (droite) de HIEC/shCNS et HIEC/sh $\alpha 8$. L'expression de la sous-unité intégrine $\beta 1$ a été utilisée comme contrôle de normalisation. (D) Immunobuvardage représentatif des quantités de RhoA-GTP (forme active) détectées par pull-down rhotéine chez les HIEC/shCNS et HIEC/sh $\alpha 8$ comparativement aux niveaux d'expression de RhoA total. L'analyse densitométrique des résultats obtenus en immunobuvardage est présentée sous forme d'histogramme (n=4, **: $p \leq 0,005$). Des images en microscopie à contraste de phase illustrent la migration des cellules HIEC/shCNS (E) et des cellules sh $\alpha 8$ (F) au-delà du front d'une blessure induite 48 heures post-ensemencement et en présence de 2 mM d'hydroxyurée (barre=100 μ m). (G) Histogramme représentant le nombre moyen de cellules ayant migrées au-delà du front de blessure (n=5, ***: $p \leq 0,0001$).



Tiré de Benoit & al., Biology of the Cell. 2009

Figure-24: L'intégrine $\alpha 8\beta 1$ et l'activation de la GTPase RhoA

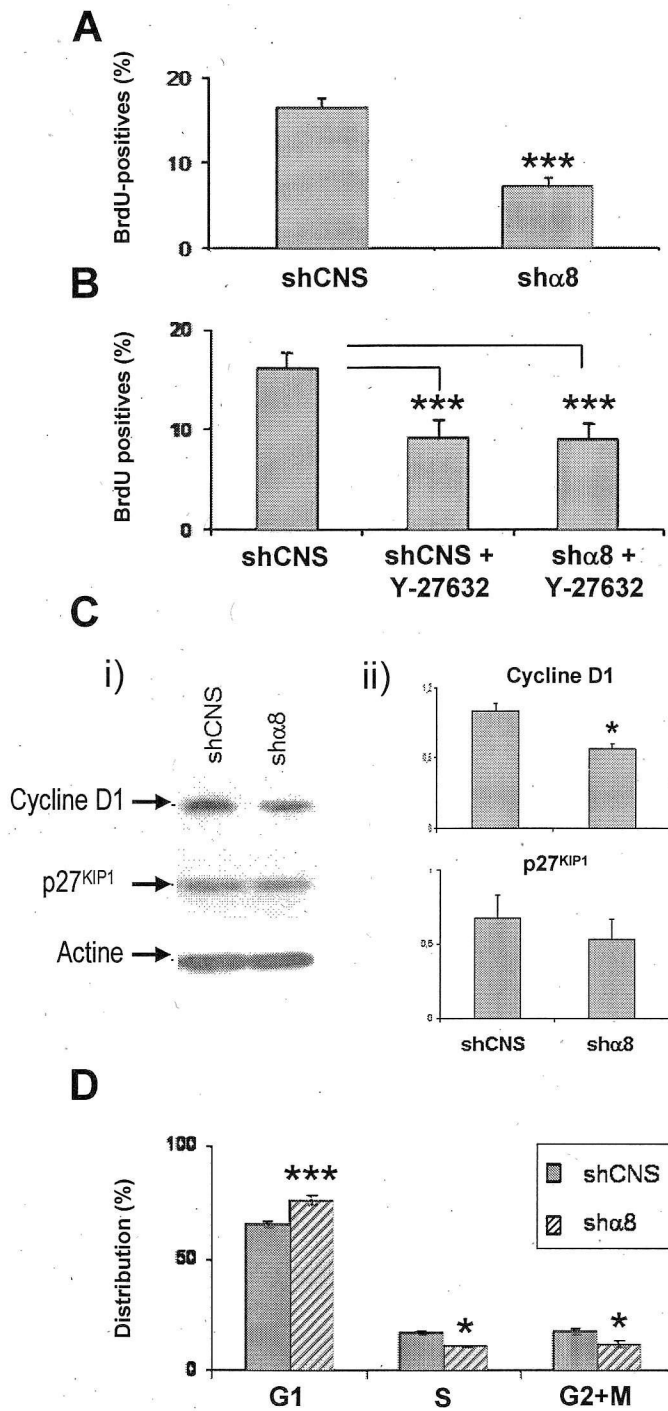
3.19 L'abolition de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ affecte la progression du cycle cellulaire

Les effets de la voie RhoA/ROCK au niveau de la régulation de la progression du cycle cellulaire ont déjà été démontrés dans la littérature (Croft et Olson, 2006; Walker et Assoian, 2005). En ce sens, nous avons analysé les niveaux de prolifération cellulaire chez les HIEC/sh $\alpha 8$ et les HIEC/shCNS par des essais d'incorporation de BrdU. Ces expériences nous ont indiqué une diminution d'environ 50% du nombre de cellules BrdU-positives chez les HIEC/sh $\alpha 8$ comparativement aux cellules contrôles (Figure 25A). De plus, les cellules HIEC/shCNS traitées avec l'inhibiteur de ROCK (Y-27632) ont affiché une diminution des quantités de cellules BrdU-positives comparable à celle des HIEC/sh $\alpha 8$. Toutefois, la combinaison shRNA $\alpha 8$ avec le Y-27632 chez les HIEC n'a conduit à aucun effet additif sur l'inhibition de la prolifération (Figure 25B). Cette observation signifie que l'effet inhibiteur de la prolifération obtenue en absence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ passe spécifiquement par l'implication fonctionnelle de ROCK.

Des expériences en immunobuvardage ont montré que les cellules HIEC/sh $\alpha 8$ présentaient une diminution significative de l'expression de la cycline D1 (Figure 25C). Cependant, l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{KIP1} n'est pas affectée de manière significative par l'absence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$. Ces deux régulateurs du cycle cellulaire ont déjà été rapportés comme étant des cibles potentielles de la voie RhoA/ROCK (Croft et Olson, 2006). Des expériences

Figure 25: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ et la progression du cycle cellulaire chez les cellules HIEC

Les résultats d'expériences d'incorporation de BrdU portés en histogrammes illustrent le pourcentage de cellules en phase S chez les HIEC/shCNS comparativement aux HIEC/sh $\alpha 8$ (A) ainsi que chez les HIEC/shCNS sans inhibiteur comparativement aux HIEC/shCNS et HIEC/sh $\alpha 8$ traitées avec 20 μ M de Y-27632 (n=3, ***: $p \leq 0,0005$). (C) Quantification des niveaux d'expression de la cycline D1 et de p27^{KIP1} chez les HIEC/shCNS et les HIEC/sh $\alpha 8$. Les immunobuvardages représentatifs sont exposés en (i) tandis que les histogrammes se rapportant aux analyses densitométriques des résultats d'immunobuvardage correspondant se retrouvent en (ii). L'expression de l'actine a été utilisée comme contrôle de normalisation (n=3, *: $p = 0,012$). (D) Histogramme représentant la distribution des HIEC/shCNS et des HIEC/sh $\alpha 8$ à travers les phases G1, S et G2+M du cycle cellulaire. Ces données ont été obtenues suite à des analyses cytométriques par balayage laser en conditions adhérentes (iCys) (n=3, *: $p \leq 0,015$, ***: $p \leq 0,0002$).



Tiré de Benoit & al., Biology of the Cell. 2009

Figure-25: L'intégrine α 8 β 1 et la progression du cycle cellulaire chez les cellules HIEC

cytométriques par balayage laser en conditions adhérentes nous ont permis d'établir le profil de distribution, à travers les différentes phases du cycle cellulaire, des cellules HIEC/sh α 8 comparativement aux cellules HIEC/shCNS. Les résultats obtenus ont démontré un pourcentage significativement plus élevé de cellules HIEC/sh α 8 en phase G1 par rapport aux cellules contrôles (Figure 25D). Cette observation s'accompagne aussi de diminutions significatives des niveaux de cellules en phases S et G2/M, toujours chez les HIEC/sh α 8.

3.20 L'absence de l'intégrine α 8 β 1 affecte le recrutement de la vinculine aux points d'adhésion focaux sans perturber la localisation de la paxilline

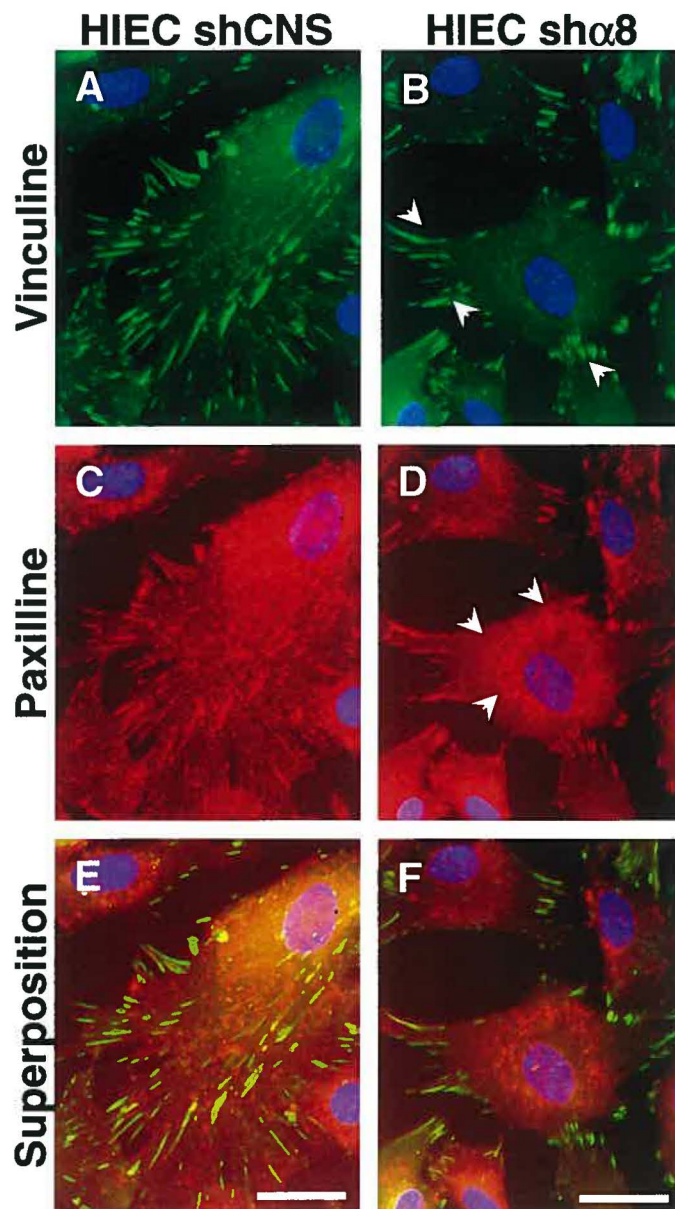
Dans le but d'approfondir la caractérisation fonctionnelle de l'intégrine α 8 β 1 dans le recrutement des composantes des points d'adhésion focaux, nous avons d'abord ensemencé des cellules HIEC/sh α 8 et HIEC/shCNS sur des lamelles de verre enduites de sérum, qui constitue une source de ligands RGD tels que la fibronectine et la vitronectine. Ensuite, nous avons établi, par immunofluorescence, le nombre moyen de points d'adhésion focaux vinculine et paxilline-positifs par cellule dans chacune des deux lignées de HIEC (Tableau-7). En somme, les HIEC de type sauvage et les HIEC/shCNS exhibent un nombre comparable de point d'adhésion focaux vinculine et paxilline-positifs, soit environ 70 à 80 par cellule. Ces structures sont larges, soit un signe de maturité (Zaidel-Bar et al., 2004; Zimmerman et al., 2004), et distribués uniformément en périphérie

de la cellule (voir Benoit & al., 2009 ; suppl.2A, B). Pour leur part, les HIEC/sh $\alpha 8$ ensemencées sur sérum ont démontré une diminution importante du nombre de points d'adhésion focaux vinculine-positifs, comparativement aux cellules contrôles, tandis que la distribution de la paxilline n'est pas affectée par l'absence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ (Tableau-7). Des observations similaires ont été faites chez les cellules HIEC de type sauvages traitées avec l'inhibiteur de ROCK (Y-27632) (Tableau-7). Ces observations suggèrent que le recrutement de la vinculine, mais pas celui de la paxilline, dépend de la présence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ et de son action sur l'activation de la voie RhoA/ROCK. De plus, l'ensemencement de HIEC/shCNS sur une matrice de collagène de type-I, soit un substrat dépourvu de motif RGD, conduit à une diminution significative du nombre de points d'adhésion focaux vinculine-positifs par rapport aux structures paxilline-positives (Tableau-7).

Pour documenter plus amplement les différences de localisation cellulaire de la vinculine et de la paxilline suite à l'abolition de la sous-unité $\alpha 8$, nous avons effectué un co-marquage en immunofluorescence de ces deux composantes des points d'adhésion focaux. D'abord, nous avons remarqué un patron de localisation similaire entre la vinculine et la paxilline, au niveau des points d'adhésion focaux matures, en périphérie des HIEC/shCNS (Figure 26A, C, E). Chez les HIEC/sh $\alpha 8$, nous avons remarqué la présence d'une grande quantité de structures paxilline-positives mais dépourvues de vinculine au centre des cellules. Dans ce cas, seulement 30% des points paxilline-positifs le sont aussi pour la vinculine et sont localisés en périphérie de la cellule (Figure 26B, D, F).

Figure 26: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence la localisation de la vinculine mais n'affecte pas celle de la paxilline chez les cellules HIEC

Immunofluorescences représentatives de la distribution de la vinculine (vert) (A et B) ainsi que celle de la paxilline (rouge) (C et D) chez les HIEC/shCNS (A et C) et les HIEC/sh $\alpha 8$ (B et D), 24 heures post-ensemencement. La superposition des images de la détection de la vinculine et de la paxilline chez les HIEC/shCNS (E) et les HIEC/sh $\alpha 8$ (F) illustrent une distribution différentielle observée uniquement en absence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ (Barre=25 μ m).



Tiré de Benoit & al., Biology of the Cell. 2009

Figure-26: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence la localisation de la vinculine mais n'affecte pas celle de la paxilline chez les cellules HIEC

Tableau-7: Quantification des points d'adhésion focaux vinculine et paxilline positifs

Nbr. points focaux par cellule (n=8)	Substrat de type RGD				Collagène
	HIEC wt	HIEC shCNS	HIEC sh α 8	HIEC Y-27632	HIEC shCNS
Vinculine	70.83 ± 2.24	78.90 ± 9.76	20.33 ± 1.19	15.13 ± 1.11	18.63 ± 2.00
Paxilline	69.75 ± 5.89	73.88 ± 4.38	77.25 ± 6.84	73.38 ± 12.27	76.00 ± 7.45

3.21 L'absence de l'intégrine α 8 β 1 réduit la susceptibilité à l'anoïkose des cellules épithéliales intestinales indifférenciées

L'intégrité des points d'adhésion focaux est reconnue pour jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de la survie cellulaire. D'une part, il a été démontré que la survie des cellules épithéliales intestinales humaines dépendait de l'activation constante, par la matrice extracellulaire, des récepteurs intégrines de type β 1. Ce phénomène se trouve finement régulé par un mécanisme de signalisation intracellulaire impliquant FAK/Src ainsi que les voies MEK/Erk et PI3-K/Akt (Bouchard et al., 2007; Bouchard et al., 2008; Harnois et al., 2004). Plus particulièrement, l'activation de la voie PI3-K/Akt a été démontrée comme étant cruciale à la survie des cellules épithéliales intestinales indifférenciées (Bouchard et al., 2007). De plus, il a aussi été démontré que la présence de la vinculine dans les points d'adhésion focaux était essentielle au maintien du

mécanisme de régulation de l'activité de FAK (Barry et Critchley, 1994). Plus précisément, en présence de vinculine au niveau des points d'adhésion focaux, la paxilline interagit avec le complexe FAK-vinculine de manière à ce que la régulation de l'activité de FAK, par auto-phosphorylation de sa tyrosine 397, reste dépendante de l'adhésion de la cellule à son substrat. Toutefois, des expériences faites chez des cellules fibroblastiques ont démontré que l'absence de la vinculine permettait une configuration différente de l'interaction entre la paxilline et FAK. Cette même interaction conduit à une activation constitutive de FAK indépendamment de l'engagement des récepteurs intégrines avec la matrice extracellulaire, ce qui supprime ainsi la susceptibilité de la cellule à la mort par perte d'adhésion ou anoïkose (Subauste et al., 2004; Ziegler et al., 2006). Chez les cellules HIEC, qui constituent un modèle intestinal indifférencié, nous avons évalué l'impact de l'abolition de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ sur le déclenchement du phénomène apoptotique en conditions de culture adhérentes et en absence de sérum. Pour ce faire, des immunobuvardages mettant en évidence le clivage protéolytique de la poly ADP-ribose polymérase (PARP), une signature caractéristique de l'activation des caspases 3 et 7 (Germain et al., 1999; Tewari et al., 1995), ont été effectués sur des lysats de cellules HIEC de type sauvage, des HIEC/shCNS et des HIEC/sh $\alpha 8$. Concrètement, la présence d'un fragment de PARP d'une taille de 86 kDa est indicatrice du clivage de la forme native de 116 kDa suite à l'activation des caspases. Des cellules HIEC gardées en suspension sur une période de 18 heures ont été utilisées comme contrôle positif du clivage protéolytique de PARP suite à l'induction de l'anoïkose. Les expériences

d'immunobuvardage ont démontré qu'en absence de sérum et en condition de culture adhérente, caractérisée par un attachement et un étalement des cellules sur leur substrat, aucune des conditions testées n'a révélé la présence de la forme clivée de PARP à 86 kDa (Figure 27A). Ainsi, l'absence de $\alpha 8 \beta 1$ chez les HIEC n'induit pas de phénomène apoptotique lorsque celles-ci adhèrent à un substrat.

Considérant la nécessité de $\alpha 8 \beta 1$ dans le recrutement de la vinculine aux points d'adhésion focaux et l'impact de ce phénomène sur la modulation de l'activité de FAK, nous nous sommes demandé si l'absence d'une telle intégrine pourrait avoir un effet sur la susceptibilité des HIEC à l'anoïkose. Ainsi, nous avons conservé des cellules HIEC/shCNS et HIEC/sh $\alpha 8$ en suspension pendant 18 heures, en absence de sérum et à l'intérieur de boîtes de pétris dont la surface d'adhérence est enduite de BSA afin d'y prévenir l'attachement des cellules. De plus, nous avons inhibé la production et la sécrétion d'éléments endogènes de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine et divers types de collagènes, en incubant les cellules avec un inhibiteur général de la synthèse protéique, soit la cycloheximide. Dans ce contexte, l'activation de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ a été rendue possible grâce à l'utilisation d'un peptide RGD soluble. De plus, la prévention de l'activation des intégrines αV a été assurée par l'utilisation d'un anticorps bloquant. Dans ces conditions, nous avons observé que les cellules HIEC dépourvues d'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ démontraient une baisse d'environ 50% des niveaux de la forme clivée de PARP de 86 kDa par rapport aux cellules HIEC/shCNS (Figure 27B). Afin de confirmer la validité de ces observations, nous avons effectué des essais en cytométrie de flux afin de dénombrer les taux de cellules

Figure 27: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence l'induction des phénomènes apoptotiques chez les cellules HIEC en suspension

(A) immunobuvardages représentatifs de la détection de la forme complète (116 kDa) et la forme clivée (89 kDa) de PARP chez les HIEC de type sauvage, les HIEC/shCNS et les HIEC/sh $\alpha 8$ en conditions adhérentes. Des HIEC de type sauvage gardées en suspension pendant 18 heures ont été utilisées comme contrôle positif tandis que l'expression de l'actine a été utilisée comme contrôle de normalisation. (B) Immunobuvardage représentatif de la détection des formes de 116 kDa et 89 kDa de PARP chez des HIEC/shCNS et des HIEC/sh $\alpha 8$ gardées en suspension pendant 18 heures. L'expression de l'actine a été utilisée comme contrôle de normalisation et les quantités relatives de la forme clivée (89 kDa) de PARP observées dans chaque condition ont été portées en histogramme (n=5, **: p=0,002). (C) Analyses par cytométrie de flux du nombre de cellules marquées positivement à l'iodure de propidium chez des cultures de HIEC/shCNS en condition adhérente ainsi que de HIEC/shCNS et HIEC/sh $\alpha 8$ gardées en suspension pendant 18 heures. (D) Histogramme illustrant les quantités relatives de cellules marquées à l'iodure de propidium pour chaque condition analysée où la condition contrôle sh/CNS adhérentes est arbitrairement fixée à 1 (n=6, ***: p \leq 0,0001).

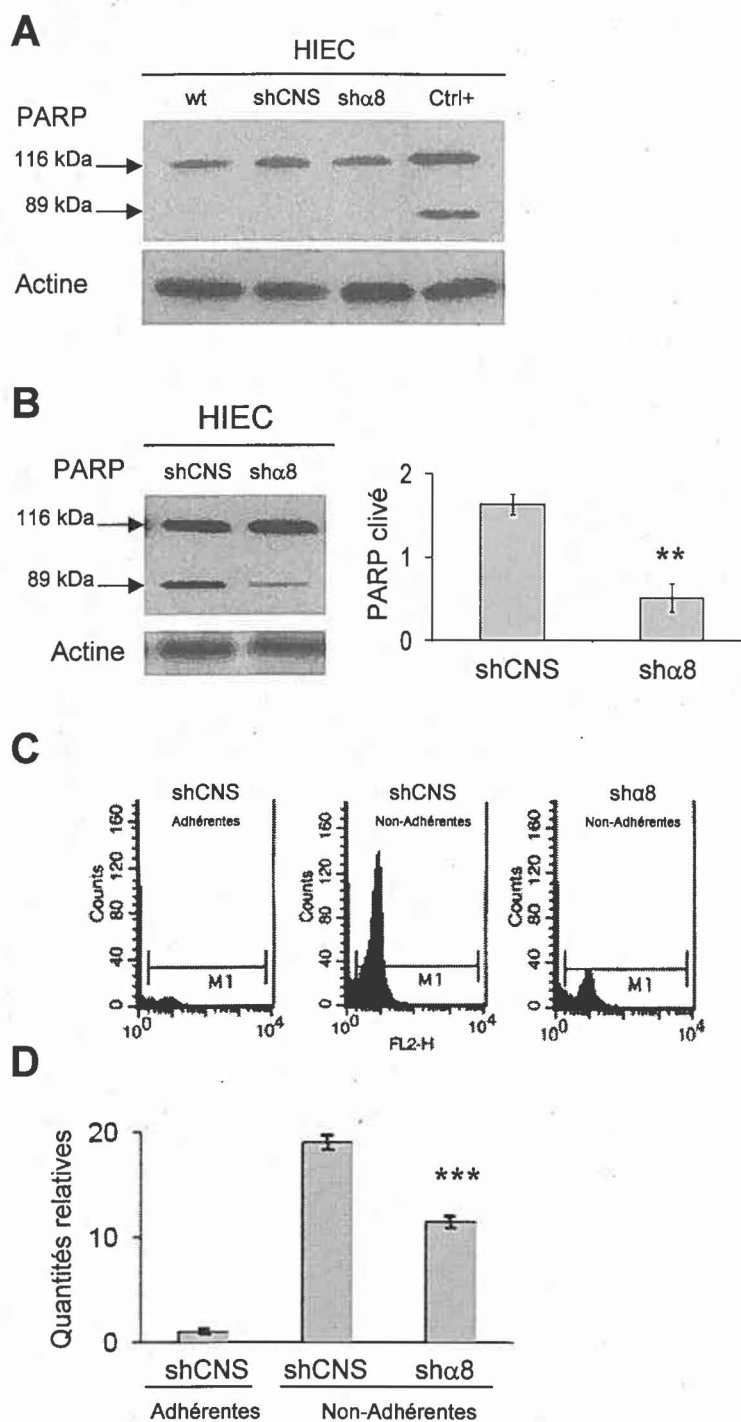


Figure-27: L'intégrine α 8 β 1 influence l'induction des phénomènes apoptotiques chez les cellules HIEC en suspension

marquées par l'iodure de propidium, un fluorophore se liant uniquement à l'ADN des cellules dont la membrane plasmique est compromise par les différents phénomènes de mort cellulaire (Darzynkiewicz et al., 1992; Farias et al., 2005). Les cellules HIEC/shCNS en suspension ont démontré des taux de cellules marquées à l'iodure de propidium environ 20 fois supérieurs à ceux enregistrés chez les cellules HIEC/shCNS gardées en conditions adhérentes. En revanche, ces taux de cellules marquées sont d'environ 45% chez les HIEC/sh $\alpha 8$ en suspension comparativement aux HIEC/shCNS cultivées dans les mêmes conditions (Figure 27C, D).

Des études réalisées par l'équipe du Dr Vachon ont bien démontré l'importance de l'activation de FAK/Src et de la voie PI3-K/Akt dans le maintien de la survie des cellules épithéliales indifférenciées de l'intestin humain (Bouchard et al., 2007; Gauthier et al., 2001). De plus, si on considère l'importance de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ dans le recrutement de la vinculine aux points d'adhésion focaux et de l'importance de celle-ci dans le maintien du caractère modulable de l'activité de FAK, l'étude des niveaux de phosphorylation sur tyrosine 397 de la kinase FAK, chez les HIEC soumises à diverses conditions de culture nous apparaissait important. Des expériences d'immunobuvardage nous ont permis d'évaluer les niveaux de phosphorylation de FAK par rapport à la quantité de FAK total. Celles-ci ont démontré une diminution significative du ratio phospho-FAK / FAK total d'environ 50% chez les cellules HIEC/shCNS, gardées en suspension dans les conditions décrites précédemment, comparativement aux ratios observés chez les cellules HIEC/shCNS et HIEC/sh $\alpha 8$ adhérentes. De plus, en absence de

l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$, les HIEC gardées en suspension 18 heures retrouvent des niveaux de FAK phosphorylée sur la tyrosine 397 comparables aux cellules adhérentes (Figure 28A). Afin de confirmer l'effet direct de l'abolition de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ sur le maintien de la voie pro-survie FAK/PI3-K/Akt, nous avons mesuré par immunobuvardage les niveaux d'activation par phosphorylation de la protéine Akt-1 chez les HIEC/shCNS et HIEC/sh $\alpha 8$ maintenues en suspension pendant 18 heures selon les conditions décrites précédemment. Nous avons remarqué que les cellules HIEC/shCNS gardées en suspension 18 heures démontraient des niveaux d'activation de Akt-1 environ 60% plus faibles que ceux observés chez les HIEC/sh $\alpha 8$ dans les mêmes conditions. De plus, l'incubation des HIEC/sh $\alpha 8$ en suspension avec un inhibiteur pharmacologique de PI3-K, soit le LY-294002, a conduit à une restauration du phénotype observé chez les HIEC/shCNS dans les mêmes conditions de culture (Figure 28B). Cette restauration se caractérise par une diminution de l'activation de Akt-1, accompagnée par une augmentation du clivage protéolytique de PARP, selon un profil comparable à celui observé chez les HIEC/shCNS maintenues en suspension.

Ces résultats suggèrent donc que la présence de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ contribue au maintien de la susceptibilité à l'anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales de la crypte via le maintien du caractère modulable du mécanisme de signalisation FAK/PI3-K/Akt.

Figure 28: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence la transduction de signaux intracellulaires modulant la survie des cellules cryptales humaines HIEC

(A) Immunobuvardages représentatifs de la détection de FAK total et de sa forme phosphorylée sur la tyrosine 397 chez les HIEC shCNS et HIEC/sh $\alpha 8$ en conditions adhérentes et gardées en suspension pendant 18 heures (non-adhérentes). Les quantités relatives de phospho-FAK par rapport à FAK total observées pour chaque condition ont été portées en histogramme suivant l'analyse densitométrique des résultats obtenus en immunobuvardage (n=4, ***: $p \leq 0,0001$).

(B) Immunobuvardages représentatifs de la détection des formes de 116 kDa et de 89 kDa de PARP, de Akt-1 ainsi que de sa forme phosphorylée (phospho-Akt) chez les HIEC/shCNS, HIEC/sh $\alpha 8$ non-traitées et HIEC/sh $\alpha 8$ traitées avec 30 μ M de LY-294002 gardées en suspension pendant 18 heures. L'expression de l'actine a été utilisée comme contrôle de normalisation. Les quantités relatives de phospho-Akt par rapport à Akt total et de PARP clivé (89 kDa) par rapport au contrôle actine, observées pour chaque condition étudiée, ont été portées en histogramme suivant l'analyse densitométrique des résultats obtenus en immunobuvardage (n=3, **: $p \leq 0,009$).

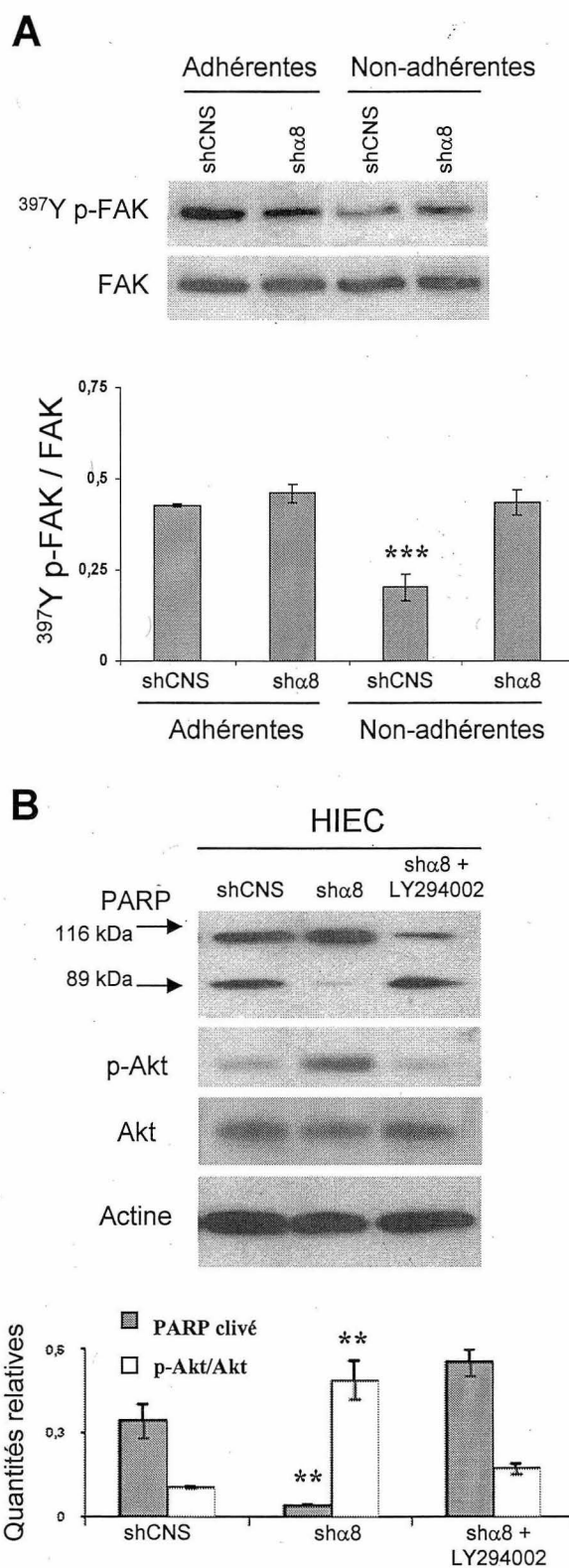


Figure-28: L'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence la transduction de signaux intracellulaires modulant la survie des cellules cryptales humaines HIEC

IV – Discussions et conclusions

Il est relativement bien documenté que l'épithélium intestinal utilise divers mécanismes afin de préserver sa capacité à se renouveler constamment. Une telle aptitude demande une régulation complexe et concertée de certains processus biologiques fondamentaux tel que la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire. Dans un article publié en 1996 par l'équipe du Dr Beaulieu, on peut lire à la dernière phrase de la conclusion «L'élaboration du modèle cellulaire normal HIEC fourni de nouvelles avenues afin d'investiguer l'implication des hormones, des facteurs de croissance et de la matrice extracellulaire au niveau des fonctions cellulaires de l'épithélium intestinal humain, telles que la migration, la prolifération et ultimement, la différenciation cellulaire» (Perreault et Beaulieu, 1996). Dans ce sens, mes travaux de doctorat ont permis d'approfondir la caractérisation du modèle HIEC en démontrant l'expression chez celles-ci de divers marqueurs spécifiques des cellules souches et progénitrices de l'épithélium intestinal. De plus, l'expression ectopique de facteurs de transcription clés dans le processus de différenciation entérocytaire chez les HIEC a mené à l'établissement d'un premier modèle cellulaire humain non-cancéreux permettant l'étude de la différenciation entérocytaire ainsi que ses phénomènes associés *in cellulo*. À titre d'exemple, l'utilisation de ce modèle, combiné à l'invalidation d'un mécanisme connu pour inhiber la différenciation

des cellules souches embryonnaires, soit les complexes polycomb, nous a permis d'identifier un nouveau système de contrôle de la différenciation entérocytaire. Dans le contexte de la crypte intestinale humaine, les complexes polycomb sont aussi pressentis pour avoir un rôle important dans la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches. Les observations faites à partir de notre modèle de différenciation entérocytaire inductible nous ont aussi permis d'identifier un nouveau récepteur intégrine présent chez les cellules épithéliales indifférenciées et modulé à la baisse lors de la différenciation entérocytaire. En effet, l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ a, pour la première fois, été localisée puis fonctionnellement caractérisée dans une structure épithéliale. Cette intégrine exerce elle-même un rôle dans le maintien de l'homéostasie cryptale au niveau la muqueuse de l'intestin grêle humain. Les sections subséquentes expliquent en détails l'interprétation ainsi que la portée des principaux résultats scientifiques générés au cours de mes travaux de doctorat en plus de fournir des éléments spéculatifs sur l'influence que ceux-ci exerceront sur l'avancement des connaissances en biologie cellulaire.

4.1 Cdx-2 et HNF1 α déclenchent le programme de différenciation entérocytaire en collaboration avec GATA-4 chez les cellules épithéliales progénitrices humaines

Dans la portion de mes travaux portant sur l'influence de l'expression ectopique des facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4, seuls ou en combinaison, chez les

cellules HIEC, nous avons évalué le rôle de ceux-ci sur la prolifération cellulaire, l'expression de gènes liés à la différenciation et l'acquisition d'une morphologie polarisée. Concrètement, nos résultats suggèrent que HNF1 α représente le facteur clé de l'initiation du processus de différenciation entérocytaire et agit en collaboration avec Cdx-2 et GATA-4 afin d'exercer un rôle plus large aux niveaux morphologique et fonctionnel chez les cellules épithéliales de l'intestin grêle humain. Dans un premier temps, nous avons montré que les facteurs de transcription Cdx-2 et HNF1 α sont exprimés dans toutes les cellules épithéliales de l'axe crypte-villosité, à l'exception de quelques cellules isolées à la base des compartiments cryptaux. Bien que ces cellules soient localisées aux environs de la position +4, nos expériences ne démontrent pas hors de tous doutes qu'il s'agit de cellules souches. Afin de confirmer le statut exact de ces cellules Cdx-2 et HNF1 α négatives, des expériences de co-marquage, impliquant ces facteurs de transcription et un marqueur spécifique des cellules souches +4, seraient nécessaires. Le facteur Cdx-2 a été préalablement décrit comme un régulateur important de la différenciation intestinale (Gao et al., 2009). Ce titre lui est revenu principalement à cause de son importance chez les cellules de l'épithélium intestinal de rat immortalisées IEC-6 (Suh et Traber, 1996) et son effet sur l'expression génétique dans plusieurs lignées cellulaires issues de cancers colorectaux (Hinoi et al., 2002; Lorentz et al., 1997; Sakaguchi et al., 2002). Toutefois, nos expériences ont montré que la présence de Cdx-2 n'entraîne pas de changements significatifs, dans l'expression génétique et l'acquisition de structures morphologiques entérocytaires, chez les cellules de la crypte intestinale

humaine. Cependant, une altération dans la prolifération cellulaire avait déjà été observée chez les HIEC (Escaffit et al., 2006). L'absence d'expression endogène des facteurs HNF1 α et GATA-4 chez les cellules HIEC pourrait expliquer en quelque sorte l'absence d'impact significatif sur la différenciation résultant de la présence de Cdx-2. En ce sens, il a déjà été démontré que les cellules IEC-6 exprimaient des niveaux endogènes de HNF1 α et GATA-4 dans certaines conditions de culture spécifiques (Lussier et al., 2008). Un tel phénomène n'a jamais été observé chez les cellules HIEC. De plus, des études récentes faites avec les cellules IEC-6 et certains modèles murins ont démontré l'importance cruciale du facteur HNF4 α dans de la cascade de différenciation entérocytaire (Babeu et al., 2009; Lussier et al., 2008). Néanmoins, des expériences non incluses dans cette thèse de doctorat ont montrés que l'expression ectopique de HNF4 α chez les HIEC, même en combinaison avec Cdx-2, n'entraîne pas d'induction de l'expression de HNF1 α , de la sucrase-isomaltase, de Li-cadhérine et de E-cadhérine. En revanche, une induction de la DPPIV ainsi que de la néphronectine, dont l'expression est spécifique aux cellules différenciées de l'intestin humain (Benoit et al., 2007), a été observée chez les HIEC surexprimant HNF4 α seul ou en combinaison avec Cdx-2. Ces données suggèrent des rôles complémentaires pour HNF1 α et HNF4 α dans la différenciation cellulaire intestinale humaine. De plus, ces résultats supportent l'idée que d'autres facteurs de transcription, comme HNF1 α et GATA-4, sont nécessaires afin d'exercer une action concertée avec Cdx-2 (Boudreau et al., 2002) au niveau des promoteurs de gènes spécifiquement impliqués dans la différenciation des cellules épithéliales de la crypte intestinale

humaine. Tel que démontré par nos résultats, ces facteurs de transcription jouent des rôles distincts dans différentes fonctions cellulaires comme la prolifération, l'expression de gènes spécifiquement liés à la différenciation entérocytaire et la mise en place d'une polarité cellulaire.

Comme il avait été démontré précédemment dans le cas de Cdx-2 (Escaffit et al., 2006), l'expression du facteur HNF1 α cause une réduction significative de la prolifération des cellules cryptales humaines HIEC. De manière intéressante, les effets de HNF1 α et de Cdx-2, conjointement exprimés chez les HIEC, sont additifs au niveau de la répression de la prolifération cellulaire. Cela suggère que ces deux facteurs affectent des voies de régulation du cycle cellulaire distinctes. Une investigation plus approfondie de l'expression de facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, tel que la cycline D1 et l'inhibiteur des complexes kinases cycline-dépendant Cdk-4/6 p27^{KIP1} a donc été réalisée chez les HIEC exprimant Cdx-2 ou HNF1 α seuls. Ces expériences ont montré que Cdx-2 influence spécifiquement l'expression de la cycline D1 sans affecter p27^{KIP1} tandis HNF1 α contribue plutôt à moduler l'expression de p27^{KIP1} sans affecter les niveaux de cycline D1.

Parmi les différents marqueurs de différenciation des cellules épithéliales intestinales que nous avons étudiés chez les HIEC, la E-cadhérine était totalement absente chez les cellules HIEC de type sauvage. Un tel phénomène est cohérent avec ce qu'il a été rapporté précédemment dans la littérature concernant la répression de celle-ci chez les cellules progénitrices de l'épithélium intestinal humain (Escaffit et al., 2005b). Le manque de complexes de jonction cellulaire et

de bordure en brosse définie, l'absence d'expression de la Li-cadhérine et de DPPIV, combinées à la présence de marqueurs spécifiques des cellules souches ou progénitrices intestinales tels que Bmi-1, DcamKL1 et Musashi-1 renforcent l'hypothèse que les cellules HIEC sont strictement confinées à un état indifférencié. Ainsi, l'expression ectopique de facteurs de transcription pro-différenciation comme Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 chez les HIEC, leur permet de progresser vers une spécification entérocytaire tout en démontrant une diminution de l'expression de DcamKL1 et de Musashi-1. Néanmoins, l'expression de Bmi-1 n'est pas affectée par l'initiation du processus de différenciation des HIEC. Un tel phénomène pourrait être expliqué par les récentes découvertes portant sur le positionnement des groupes polycomb en amont des familles de facteurs de transcription telles que Cdx, HNF et GATA au niveau de la cascade de spécification des cellules souches embryonnaires (Boyer et al., 2006; Lee et al., 2006).

Dans une étude récente, faite au niveau de modèles murins, Cdx-2 est présenté comme un déterminant central de l'identité intestinale à travers la répression de facteurs de spécification proximale tel que Sox2 (Gao et al., 2009). En complément, Cdx-2 joue un rôle répressif sur l'expression des gènes de pluripotence comme Oct4 et NANOG lors de la spécification des tissus extraembryonnaires (Strumpf et al., 2005). Ainsi, l'expression de Cdx-2, en combinaison avec ses partenaires HNF1 α et GATA-4, pourrait expliquer la baisse d'expression de marqueurs propres aux cellules souches et progénitrices chez les HIEC. Une expression très faible de Lgr5, un marqueur spécifiquement associé

aux cellules souches de type CBC, a été observée chez les cellules HIEC. Plus précisément, les niveaux de Lgr5 détectés chez les HIEC sont comparables à ceux observés dans les fractions d'épithélium total. Combiné au fait que les HIEC n'entrent pas en état de sénescence même après une période de 30 jours de quiescence et que le polycomb Bmi-1 est exprimé à un niveau maximal suite à l'atteinte de la confluence, cette quasi absence de Lgr5 pourrait signifier que les HIEC ont une identité qui se rapproche plutôt de celle des cellules souches en position +4. En effet, la présence de Bmi-1 chez les HIEC et son rôle probable dans la répression de p16^{INK4a} représente une caractéristique intéressante des cellules souches intestinales localisées en position +4, soit une capacité persistante à l'auto-renouvellement. Cependant, bien que les données obtenues au cours de mes travaux de doctorat pointent vers l'attribution d'un statut souche aux HIEC, des expériences plus approfondies sur la fonctionnalité des mécanismes de préservation de leur état indifférencié et de leur fonction d'auto-renouvellement sont nécessaires. De plus, leur potentiel à se différencier en chacun des 4 principaux types de cellules épithéliales intestinales devra être déterminé. En sens, l'expression des facteurs de transcription Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 chez les HIEC spécifient ces dernières vers une détermination absorbante. Plus particulièrement, la présence de GATA-4 seul réprime drastiquement l'expression de Hath-1 dans les HIEC. Considérant que l'expression des facteurs GATA-5 et GATA-6 ont déjà été rapportés comme étant spécifiques à la voie sécrétrice, tandis que GATA-4 était observé uniquement chez les cellules absorbantes chez la souris (Dusing et Wiginton, 2005), il est concevable qu'une substitution de

GATA-4 par GATA-5 ou 6 puisse favoriser une détermination sécrétrice. Dans un autre ordre d'idée, les travaux d'un de nos collaborateurs japonais (Dr Kiichiro Tsuchiya, Tokyo Medical & Dental University, Japon) ont montré que l'inhibition pharmacologique de la kinase GSK-3 entraîne une stabilisation de Hath-1 suivie d'une induction de l'expression de Muc2 et de la défensine-5 chez les HIEC (Tsuchiya et al., 2009). Ainsi, quelques éléments de réponse sont déjà en place quant à la démonstration du potentiel de détermination des HIEC vers la lignée sécrétrice.

Dans le cas présent, nos résultats ont montrés que l'expression ectopique de HNF1 α seul était suffisante pour induire l'expression de la E-cadhérine, la Li-cadhérine et la DPPIV. Bien qu'une relation entre HNF1 α et la régulation de la E-cadhérine ainsi que DPPIV ait été démontrée précédemment (Erickson et al., 1999; Erickson et al., 2000; Yamagata et al., 2002), le rapport entre ce facteur et la Li-cadhérine en est ici à sa première démonstration. D'un autre côté, même si GATA-4 semble avoir peu d'effet sur la différenciation fonctionnelle des HIEC, il est en revanche essentiel à l'induction de structures multicellulaires lorsque exprimé en compagnie de HNF1 α et Cdx-2. Les analyses en microscopie électronique ont aussi démontré la présence de structures propres aux entérocytes, telles que des microvillosités à la surface luminale des HIEC. L'apparition de ces microvillosités est dépendante de la présence de GATA-4. De plus, nos études ont montré un rôle pour GATA-4 dans la régulation positive de l'expression de gènes encodant des protéines impliquées dans l'établissement de la polarité entérocytaire comme la zonula-occludens-2, la cinguline, la claudine 11 et la

villine-2. Dans le même ordre d'idée, des études publiées par l'équipe du Dr Beaulieu ont déjà démontré l'importance du facteur GATA-4 dans le maintien de l'expression de la claudine-2 chez les cellules Caco-2/15 en différenciation (Escaffit et al., 2005a). Ainsi, des expériences mesurant la résistance trans-épithéliale, effectuées sur des monocouches de HIEC exprimant les facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 et des cellules contrôles, pourrait confirmer l'établissement de complexes de jonctions dans ce modèle de différenciation entérocytaire. En contre partie, le facteur GATA-4 a aussi démontré un effet répresseur sur l'expression de la E-cadhérine chez les cellules HIEC en différenciation. Ce phénomène pourrait être expliqué par l'implication de ce facteur dans la répression transcriptionnelle de gènes spécifiques suivant son interaction avec Fog1 (Beuling et al., 2008). De plus, mise à part la E-cadhérine, les expériences par micropuces à ADN ont mises en lumière plusieurs autres gènes réprimés en présence de GATA-4.

En somme, d'un point de vue fonctionnel, Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 agissent conjointement afin de réguler l'expression de gènes spécifiques aux entérocytes différenciés tels que ceux analysés au cours de mes travaux. De plus, ces facteurs sont connus pour réguler d'autres marqueurs bien caractérisés comme la lactase-phlorizine hydrolase (Bosse et al., 2006a; Krasinski et al., 2001; Mitchelmore et al., 2000; Troelsen, 2005), la «Fatty acid binding protein» (FABP1) (Divine et al., 2003) et l'adénosine désaminase (Dusing et al., 2000). En plus des différents rôles d'activateur et de répresseur transcriptionnel suggérés précédemment, il est possible que ces facteurs de transcription jouent aussi d'autres rôles dans

l'homéostasie de la crypte intestinale. Par exemple, il a été suggéré qu'un équilibre entre l'expression de GATA-4 et celle de CDP serait nécessaire à la régulation adéquate de l'expression de la sucrase isomaltase (Fang et al., 2006). D'autre part, nous n'avons observé que les niveaux d'expression de chacun des facteurs de transcription doivent être comparable aux conditions physiologiques. Par exemple, nous avons noté qu'une trop forte expression de Cdx-2 chez les HIEC empêchait l'induction de la E-cadhérine. C'est aussi le cas pour GATA-4 qui, lorsqu'il est exprimé trop fortement, réprime l'initiation du processus de différenciation global. De plus, considérant les faibles niveaux d'expression de certains marqueurs de différenciation en comparaison avec ceux observés chez les cellules Caco-2/15 ou dans l'épithélium intestinal humain adulte, on constate que l'état de différenciation est nettement incomplet chez les cellules HIEC exprimant Cdx-2, HNF1 α et GATA-4. Dans cette optique, il faut absolument considérer la participation potentielle de certains autres facteurs dans la régulation du processus global de différenciation entérocytaire, tels que les gènes de la famille Hox, les facteurs Pax ainsi que les protéines du groupe polycomb (Ng et Gurdon, 2008; Russell et al., 2004; Westerman et al., 2003).

4.2 Les complexes polycomb agissent à titre de répresseur de la différenciation entérocytaire au niveau de la crypte intestinale humaine

La fonctionnalité des complexes polycomb a été décrite de manière exhaustive dans la littérature au niveau des cellules souches embryonnaires, hématopoïétiques et cancéreuses (Kashyap et al., 2009; Lee et al., 2006; Liu et al., 2006; Wang et al., 2010). Toutefois, il n'y a que très peu de connaissances se rapportant à l'implication d'un tel mécanisme de répression transcriptionnel chez des cellules progénitrices déterminées. D'une part, nous avons pu démontrer que la pierre angulaire de l'assemblage du complexe initiateur de la machinerie polycomb, soit SUZ12, était présente au niveau de la muqueuse intestinale humaine. Plus précisément, SUZ12 est localisé dans les noyaux des cellules épithéliales de la crypte de l'intestin grêle et du colon humain, chez le fœtus et chez l'adulte. Sa présence s'étend jusqu'à la jonction crypte-villosité dans l'intestin grêle tandis qu'elle se restreint à la portion inférieure de la glande dans le côlon. La mise en évidence combinée de SUZ12 et de la forme mature de la sucrase-isomaltase a permis de démontrer que SUZ12 subit une baisse d'expression drastique chez les cellules du haut de la crypte et villositaires pleinement différenciées. De plus, une baisse d'expression de SUZ12 est également notée au fond des cryptes dans l'intestin grêle, correspondant avec la présence des cellules de Paneth à ce site. Cette baisse d'intensité de marquage de SUZ12 n'a pas été observée au niveau du colon adulte et dans les tissus fœtaux où les cellules de Paneth sont absentes.

Considérant les informations relatives à la localisation de SUZ12, on peut se demander si la machinerie polycomb, qui a normalement pour but de préserver l'état indifférencié des cellules souches, pourrait jouer un rôle addionnel sur les cellules de la crypte intestinale humaine. D'une part, l'épithélium intestinal a besoin de se renouveler constamment et pour ce faire, il doit maintenir une population de cellules prolifératives. Cependant, il existe un écart positionnel important entre leur détermination et l'atteinte d'un phénotype pleinement différencié. Ainsi, afin de préserver sa population de cellules progénitrices prolifératives, l'épithélium intestinal de la crypte se doit de présenter un mécanisme répressif de la différenciation cellulaire terminale. Nous avons déjà montré que les cellules cryptales HIEC pouvaient entreprendre un processus de différenciation entérocytaire suite à l'expression ectopique des facteurs Cdx-2, HNF1 α et GATA-4. Nous avons aussi montré que cette différenciation n'est que partielle. Cependant, il est possible que la présence active de la machinerie polycomb chez les HIEC, contribue à maintenir ce frein sur la différenciation intestinale même si les cellules en question ont déjà obtenues leur signal de spécification. Dans la même veine, il est bien connu que les cellules Caco-2/15 prennent jusqu'à 30 jours pour atteindre leur différenciation maximale (Pageot et al., 2000; Sambuy et al., 2005). L'invalidation de SUZ12 chez les cellules HIEC, tout comme chez les Caco-2/15, a conduit à une réduction nette de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3. Cette marque épigénétique représente la signature moléculaire de l'activité des complexes répresseurs polycomb. Ce phénomène est accompagné par un arrêt quasi-total de prolifération cellulaire

quelques passages après l'introduction de la construction shRNA. L'inhibition de l'activité de Bmi-1 et l'entrée en sénescence subséquente des cellules HIEC pourrait expliquer ces observations. Pour en faire la démonstration, l'expression de p16^{INK4a} et d'autres gènes du locus *INK4/ARF* devront être analysés dans ces mêmes conditions. En causant une inhibition de l'expression de SUZ12 chez des HIEC déjà compromises vers la différenciation, nous avons observé des niveaux d'expression de la sucrase-isomaltase environ 4 fois supérieurs à la normale. Dans ces conditions, une augmentation de DPPIV est aussi observée mais celle-ci est plus discrète que dans le cas de la sucrase-isomaltase. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que les facteurs Cdx-2 et HNF1 α induisent déjà au départ une forte expression de DPPIV, ce qui n'est pas le cas pour l'expression de la sucrase-isomaltase. Pour ces expériences, le facteur GATA-4 n'a pas été introduit au système d'expression ectopique considérant sa participation négligeable dans la différenciation entérocytaire fonctionnelle. L'inhibition de SUZ12 chez les Caco-2/15 entraîne aussi une hausse massive de l'expression de la sucrase-isomaltase qui indique une accélération du processus de différenciation entérocytaire dans ce modèle. Il peut paraître surprenant de voir une forte expression de SUZ12 chez les cellules Caco-2/15 post-confluentes mais il faut toutefois garder en tête la nature cancéreuse de cette lignée. En effet, il a été démontré que l'action des groupes polycomb jouait un rôle important dans le maintien des propriétés tumorigéniques de divers types de cellules cancéreuses (Bracken et Helin, 2009; Kashyap et al., 2009; Mathews et al., 2009). Les résultats spectaculaires relatifs à l'augmentation des niveaux de sucrase-isomaltase observés chez les HIEC et les Caco-2/15

permettent de croire que les groupes polycomb exercent une répression spécifique sur l'expression de ce marqueur de différenciation. Néanmoins, la présence de SUZ12 dans la portion inférieure de la glande colique adulte suggère un rôle plus large pour ce système de répression épigénétique, considérant l'absence normale de sucrase-isomaltase à cet endroit. Finalement, les analyses par micropuces à ADN renforcent notre théorie proposant l'existence d'un système de freinage de la différenciation de l'épithélium intestinal exercé par les groupes polycomb. En effet, un grand nombre de gènes associés au processus de différenciation sont significativement modulés suite à l'abolition de l'expression de SUZ12 chez les HIEC exprimant Cdx-2 et HNF1 α . En absence de SUZ12, les marqueurs de cellules souches CD24 et CD44 (Gracz et al., 2010; Yang et al., 2010; Yeung et al., 2010), l'ephrine A4 associée à la morphologie cryptale (Islam et al., 2010), ainsi que la GTPase RhoA, subissent tous d'importantes baisses d'expression. Aussi, on observe une augmentation de l'activité transcriptionnelle de gènes tels que la furine et la phosphatase à double spécificité DUSP3, dont l'expression respective est associée à une différenciation accrue (Cerignoli et al., 2006; Gendron et al., 2006). De manière générale, il faut toutefois garder en tête que ces études, tout comme celles purement axées sur l'expression ectopique de Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 dans l'induction de la différenciation, ont été réalisées dans un modèle cellulaire en culture. Bien que l'on souhaite que celui-ci soit représentatif de la réalité physiologique, il reste que certaines composantes biologiques y sont absentes. Par exemple, la contribution des interactions avec le stroma, soit via la matrice extracellulaire ou par la sécrétion de facteurs solubles,

se trouve très limitée dans ce modèle en question. Ainsi, les phénomènes observés ne sont pas nécessairement représentatifs du contexte *in vivo* observé chez l'humain.

4.3 Influences de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ sur les fonctions biologiques responsables du maintien de l'homéostasie cryptale

L'étude de la matrice extracellulaire à travers l'axe crypte-villosité, a démontré l'existence de patrons d'expression distincts pour certaines glycoprotéines, en fonction de l'état de différenciation de l'épithélium adjacent (Beaulieu, 1997). Du même coup, l'épithélium intestinal adapte l'expression de ses récepteurs de surface de façon à pouvoir interagir avec son microenvironnement. Dans ce sens, des études par micropuces à ADN ont été faites dans le but de comparer les profils d'expression génétiques des HIEC de type sauvage et les HIEC en différenciation. De ce fait, certaines sous-unités intégrines dont l'expression est modulée significativement suite à l'induction de la différenciation ont été identifiées. Du nombre, on retrouve la sous-unité $\alpha 8$ dont la localisation et le rôle fonctionnel n'ont jamais été décrits au niveau d'une structure épithéliale. Au niveau de l'épithélium intestinal fœtal humain, l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ est restreinte à quelques cellules au fond des compartiments cryptaux. L'expression de cette intégrine augmente de façon drastique au cours du développement des structures musculaires lisses, à partir de la 16^e semaine de gestation (Beaulieu et al., 1993).

Ces observations s'accordent avec la caractérisation de $\alpha 8 \beta 1$ dans d'autres systèmes impliquant des cellules musculaires lisses (Schnapp et al., 1995a). Ces observations, combinées à la présence de $\alpha 8 \beta 1$ dans des fractions épithéliales purifiées ainsi que chez les cellules cryptales indifférenciées HIEC, suggèrent fortement une implication fonctionnelle de ce récepteur intégrine dans l'intestin grêle humain. L'expression de la sous-unité $\alpha 8$ est spécifiquement associée aux cellules indifférenciées de la crypte intestinale. Des expériences impliquant les cellules HIEC ont démontré que $\alpha 8 \beta 1$ interagit avec le substrat de manière RGD dépendante afin de promouvoir un assemblage adéquat des points d'adhésion focaux et du réseau de fibres de stress d'actine à travers l'activation de la GTPase RhoA. Par le fait même, l'engagement de $\alpha 8 \beta 1$ contribue au renforcement de l'adhésion cellulaire, à une restriction de la migration et une augmentation de la prolifération cellulaire. De plus l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ préserve la susceptibilité à l'anoïkose chez les cellules cryptales indifférenciées en préservant le caractère modulable de la kinase FAK. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ stimule la prolifération des cellules progénitrices de l'épithélium intestinal tout en restreignant leur progression vers le compartiment villositaire. Dans ce contexte, l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ pourrait aussi jouer un rôle de soupape de sécurité afin de favoriser l'élimination par apoptose des cellules prolifératives et indifférenciées anormalement localisées ou détachées de leur substrat.

L'adhésion cellulaire dépendante des intégrines implique l'assemblage de protéines d'échafaudage comme la vinculine et la paxilline. Les interactions cellule-matrice sont suivies de la formation séquentielle de complexes focaux

(FX), de points d'adhésion focaux (FA) et de points d'adhésion fibrillaires. Ces structures sont toutes impliquées dans la liaison du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique (Zaidel-Bar et al., 2004; Zimmerman et al., 2004). Au niveau des cultures de cellules adhérentes et bien étalées, les fibres de stress sont associées aux points d'adhésion focaux et maintiennent une tension isométrique, basée sur le système actine-myosine (ou actomyosine) et appliquée sur la matrice extracellulaire (Geiger et Bershadsky, 2001). La régulation de ce phénomène passe principalement par l'action de la petite protéine RhoA. L'impact positif de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ sur la promotion de l'adhésion cellulaire n'est pas sans précédant. En effet, d'autres groupes ont déjà rapporté que cette intégrine RDG dépendante est importante pour l'adhésion et l'étalement des cellules mésangiales, neuroendocrines, myofibroblastiques ainsi que des cellules de muscles lisses vasculaires. Chez ces dernières, l'assemblage des fibres de stress et leur liaison aux points d'adhésion focaux ont été observées suite à l'interaction de $\alpha 8 \beta 1$ avec la matrice extracellulaire (Bieritz et al., 2003; Lu et al., 2002; Muller et al., 1995; Zargham et al., 2007a). Chez les HIEC, la diminution de l'adhésion RGD dépendante, liée à la perte d'expression de $\alpha 8 \beta 1$, est accompagnée par une baisse du recrutement de la vinculine au niveau des points d'adhésion focaux et une réorganisation corticale du réseau d'actine. En guise d'explication, il est bien connu dans la littérature que l'activité RhoA exerce un contrôle sur l'assemblage des fibres de stress via l'activation de son principal effecteur ROCK. L'activation d'une telle kinase est caractérisée par une diminution de la motilité cellulaire et un accroissement des forces d'adhésion à la matrice (Cetin et al., 2004; Russo et al.,

2005; Zaidel-Bar et al., 2003). Tel que rapporté antérieurement, $\alpha 8 \beta 1$ interagit directement ou indirectement avec RhoA et facilite son recrutement à la membrane plasmique où elle sera activée par échange de GTP (Zargham et al., 2007b). Avec notre modèle sh $\alpha 8$, nous avons observé des niveaux plus faibles de RhoA membranaire que chez les cellules contrôles. Toutefois, dans ces conditions, les niveaux des GTPases Rac1 et de Cdc42 liés à la membrane sont restés constants (Benoit et al., 2010b). Les expériences de pull-down de la forme active de RhoA, impliquant le domaine de liaison à RhoA de la rhotekine, ont confirmé la baisse d'activation de RhoA en absence de $\alpha 8 \beta 1$ chez les cellules épithéliales intestinales humaines.

Croft et Olson ont rapporté que l'activation de la cascade RhoA/ROCK pouvait conduire à une diminution de l'expression de p27^{KIP1} et à une augmentation des niveaux de cycline D1 par des mécanismes indépendants (Croft et Olson, 2006). Chez les HIEC, l'effet antiprolifératif observé suite à l'inhibition de $\alpha 8 \beta 1$ s'accompagne d'une diminution de l'expression de la cycline D1. Toutefois, p27^{KIP1} ne semble pas être affecté. En conséquence, l'analyse de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a démontré une accumulation significative en phase G1, par rapport aux cellules contrôles, lorsqu'il y a abolition de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$. Ainsi, l'engagement de cette intégrine contribue à faciliter le passage de la phase G1 à la phase S chez les cellules progénitrices de la crypte intestinale humaine. De plus, considérant les effets comparables et non-additifs, entre l'abolition de $\alpha 8 \beta 1$ et l'inhibition

pharmacologique de ROCK, nos résultats suggèrent que la régulation de la prolifération exercée par $\alpha 8\beta 1$ implique principalement la cascade RhoA/ROCK.

D'une part, nous avons montré que l'expression des facteurs de transcription pro-différenciation inhibait la production de la sous-unité $\alpha 8$ chez les cellules épithéliales intestinales. Ces observations s'accordent avec le fait que les cellules épithéliales intestinales différenciées n'expriment pas $\alpha 8\beta 1$ et présentent une diminution de l'activité RhoA (Gout et al., 2001). De plus, nos observations liées à la localisation de $\alpha 8\beta 1$ dans l'axe crypte-villosité et sa capacité à influencer le cycle cellulaire concordent avec l'inhibition de RhoA normalement observée lors de la différenciation entérocytaire. Ces données concordent bien avec le fait que les cellules doivent cesser leur cycle de division avant d'entreprendre leur différenciation terminale (Pageot et al., 2000). La perte d'adhésion observée chez les HIEC, suite à l'abolition de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$, s'accorde avec la hausse de la motilité obtenue dans ces mêmes conditions. Il a été suggéré que l'activité RhoA entraîne un phénotype anti-migratoire dans plusieurs systèmes (Cetin et al., 2004; Cetin et al., 2007). D'un point de vue physiologique, les cellules souches doivent impérativement demeurer ancrées au fond des compartiments cryptaux afin de conserver leurs principales caractéristiques. Au niveau de l'épithélium intestinal, l'expression de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ est donc associé à un phénotype indifférencié tandis que chez les cellules de muscle lisse vasculaire et les fibroblastes, sa présence est plutôt associé à un état hautement différencié. Une telle dichotomie, entre le premier système et les deux seconds, pourrait s'expliquer par le comportement similaire à celui des cellules d'origine mésenchymateuses

qu'adoptent les cellules épithéliales intestinales indifférenciées. Dans ce sens, il a été clairement démontré que les carcinomes colorectaux présentent souvent un état de dédifférenciation impliquant une transition épithélio-mésenchymateuse (Lemieux et al., 2009).

Tel que mentionné plus tôt, les HIEC dépourvues de $\alpha 8 \beta 1$ démontrent une diminution de la présence de la vinculine au niveau des points d'adhésion focaux, sans pour autant que ses niveaux totaux d'expression soient affectés. Par contre, nous n'avons remarqué aucun changement substantiel dans la localisation de la paxilline, un autre élément bien caractérisé des points d'adhésion focaux (Turner, 2000) tant en absence de $\alpha 8 \beta 1$ qu'au niveau des conditions contrôles. Ces résultats suggèrent que la contribution de $\alpha 8 \beta 1$ à la formation des points d'adhésion focaux est spécifique au recrutement de la vinculine. Des observations similaires ont été faites lorsque des HIEC contrôles ont été ensemencées sur une matrice de collagène de type I. Il est à noter que le motif RGD est absent de ce type de collagène, ce qui empêche l'activation de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$. En somme, le recrutement de la vinculine, contrairement à la paxilline, dépend de l'adhésion cellulaire RGD dépendante à travers l'activation de l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$. Toutefois, il ne faut pas exclure une compensation potentielle par l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ dans un tel phénomène, puisqu'il a déjà été démontré que cette intégrine exerçait des rôles très similaires à $\alpha 8 \beta 1$ dans certains systèmes en plus d'avoir un rôle de régulateur sur l'activité de RhoA (Bieritz et al., 2003; Gout et al., 2001; Haas et al., 2003).

En se basant sur la représentation schématique de l'organisation temporelle de l'assemblage des complexes d'adhésion cellule-matrice (Zaidel-Bar et al., 2004),

le recrutement de la vinculine se produit dans les complexes focaux tardifs tandis que la paxilline est déjà présente chez les complexes focaux précoces. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'abolition de $\alpha 8 \beta 1$ affecte la maturation des complexes focaux (FX) de stade tardif et les empêche d'évoluer vers le statut de points d'adhésion focaux (FA). D'autres groupes ont déjà proposé que l'activité RhoA est impliquée dans le recrutement de certaines composantes des points d'adhésion focaux comme la vinculine (Barry et Critchley, 1994; Zaidel-Bar et al., 2003). En conséquence, nos résultats suggèrent que l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ est spécifiquement impliquée dans le recrutement de la vinculine, au niveau des points d'adhésion focaux en formation, via l'activation de la GTPase RhoA chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées.

Bien que la vinculine soit principalement considérée comme une protéine d'échaffaudage, sa présence dans les points d'adhésion focaux peut influencer la transduction de signaux intracellulaires. Dans ce sens, des études faites chez les cellules de carcinome embryonnaire de souris F9 ont démontré un rôle intéressant pour la vinculine dans le contrôle de la survie cellulaire. En effet, les cellules F9 chez lesquelles l'expression de la vinculine a été invalidée présentent une résistance à l'activation de la caspase-3 suite à un détachement du substrat. Ces mêmes cellules peuvent être re-sensibilisées à la mort cellulaire par perte d'adhésion suite à la réintroduction ectopique de la vinculine (Subauste et al., 2004). Les auteurs de cette étude ont aussi montré que les cellules dépourvues de vinculine présentaient des niveaux élevés de phosphorylation de la kinase FAK sur la tyrosine 397 en conditions non-adhérentes, comparativement aux cellules

contrôles. De plus, il a été démontré que la paxilline présente des sites d'interaction partiellement superposés pour la vinculine et la FAK (Turner, 2000). Le domaine Vt (tail) de la vinculine se trouverait ainsi en compétition avec la FAK pour la liaison à ce site d'interaction superposé. Conséquemment, l'absence de vinculine conduirait à une interaction, entre la paxilline et FAK, dont la nature conformationnelle entraînerait une activation constitutive de cette dernière (Subauste et al., 2004). En d'autres termes, la présence de la vinculine préserverait le caractère modulable de la kinase FAK en fonction de l'état d'adhésion de la cellule. En partant de ce principe, nous avons étudié le comportement des cellules HIEC en condition non-adhérentes afin de voir si l'absence de la vinculine dans les complexes d'adhésion, suite à l'abolition de $\alpha 8\beta 1$, aurait un impact sur les niveaux de survie. Tel qu'anticipé en contexte non-adhérent, une diminution du clivage de PARP ainsi que des proportions plus faibles de cellules marquées à l'iodure de propidium ont été observées en absence de $\alpha 8\beta 1$ comparativement aux cellules contrôles. Ces observations s'accompagnent aussi d'une préservation des niveaux de phosphorylation de FAK (tyr397) chez les cellules dépourvues de $\alpha 8\beta 1$ même en suspension. L'équipe du Dr Vachon a clairement démontré l'implication différentielle de certaines voies de signalisation intracellulaire en fonction de l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines (Bouchard et al., 2007). Du même coup, la PI3-K/Akt avait été identifiée comme étant cruciale à la transduction des signaux de survie chez les cellules indifférenciées. Ainsi, le maintien de niveaux élevés de phospho-Akt-1 chez les HIEC/sh $\alpha 8$ en suspension, combiné à la restauration de la

susceptibilité à l'anoïkose suite à l'inhibition de la PI3-K chez ses mêmes cellules, s'accordent avec les bases déjà établies par le groupe du Dr Vachon chez les cellules indifférenciées. Considérant les capacités de prolifération et d'adaptation élevées de certaines cellules de la crypte comme les cellules souches, nous proposons que l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ soit impliquée dans un mécanisme de surveillance visant à éliminer par apoptose les cellules détachées de leur substrat. En ce sens, il est important de mentionner qu'aucune lignées cancéreuses colorectales, ainsi qu'aucun tissu cancéreux humain ne présente une réexpression de la sous-unité $\alpha 8$ suite à une dédifférenciation de type épithélio-mésenchymateuse (Benoit et al., 2010a). Notre hypothèse est qu'une réexpression de $\alpha 8$ serait désavantageuse pour la progression tumorale puisque la restauration de cette soupape de sécurité aurait comme effet l'élimination des cellules cancéreuses dédifférenciées et non-adhérentes.

4.4 Conclusions

En somme, mes travaux au doctorat ont conduit à l'identification d'un effet coopératif des facteurs de transcription Cdx-2, HNF1 α et GATA-4 sur la modulation de la prolifération et l'acquisition de caractéristiques de différenciation chez les cellules de la crypte intestinale humaine. Mes recherches ont aussi permis d'identifier des rôles potentiels pour les groupes polycomb au niveau de la crypte intestinale humaine, notamment comme « répresseur de la

répression » de la différenciation terminale dans le tiers médian en plus d'être impliqué dans le maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches intestinales humaines. Finalement, nous proposons que l'intégrine $\alpha 8 \beta 1$ influence la nature et le positionnement des cellules souches dans la crypte intestinale humaine en augmentant leur potentiel d'adhésion, en restreignant leur motilité et en favorisant leur capacité à proliférer, tout en maintenant leur susceptibilité à l'anoïkose en cas d'un éventuel détachement de leur substrat.

V – Remerciements

Au terme de toutes ces années marquées de plusieurs réussites mais aussi parfois de frustrations, j'aimerais souligner l'apport inestimable et le soutien que certains m'ont offert tout au long de mes études au doctorat. D'abord, je tiens à remercier ma belle Christine pour son support, ses encouragements, son dynamisme et sa vision positive face la vie en général. Si j'ai pu aller jusqu'au bout, c'est en grande partie grâce à elle. Je tiens aussi à remercier mes parents Céline et Gus, qui ont toujours démontrés une grande fierté face à leur fils aîné et qui n'ont jamais cessé de le supporter dans ses entreprises de grande envergure.

Merci à tous les étudiants que j'ai côtoyé tout au long de mon passage dans le laboratoire. Certains d'entre eux sont devenus des amis précieux, comme Frédéric Paré, Jean-François Groulx et David «Scooter» Gagné. Certains d'entre eux ont aussi brillamment collaboré à mes recherches et à mon développement scientifique dont Amira Seltana, Manon Lepage et Inga Teller. Bien entendu, l'aboutissement de tous ces travaux aurait été impossible sans la contribution de nos professionnels de recherche, en particulier Éric Tremblay qui a trimé dur pour satisfaire quelques unes de mes ambitions scientifiques, ainsi que Nuria Basora et Elizabeth Herring pour leurs conseils et leur participation à la rédaction des manuscrits. Votre travail est vraiment apprécié !! Merci à Rémy Gauthier, Jeff

Larrivée, Dominique Jean, Denis Martel, Charles Bertrand et Éric Bouchard pour leur soutien technique. Merci à Gérard Papier pour ses bons conseils.

Un merci spécial aux professeurs Gaétan Thibault, Pierre H. Vachon et Guylain Boissonneault, dont certains d'entre eux ont accepté de me supporter et me fournir d'excellentes lettres de références au cours de mon doctorat et qui ont aussi accepté de siéger sur mon comité d'évaluation de thèse.

D'une manière tout à fait spéciale, je voudrais remercier mon mentor scientifique et le meilleur patron que j'ai eu dans toute ma vie, le professeur Jean-François Beaulieu. Il a su reconnaître mes capacités et m'a donné tous les outils nécessaires à mon épanouissement scientifique. Par ses conseils judicieux, il a su bien diriger mes recherches, occasionnellement calmer certaines de mes angoisses et m'apprendre certains trucs fondamentaux du métier de chercheur.

Pour finir, je tiens à remercier tous les proches et amis avec qui j'ai pu partager de bons moments tout au long de mes études universitaires : Les gars du «band», Alain, Pat et David Love III. La gang des Lions choqués ; On en aura scrappé des genoux et des tibias pendant toutes ces années! Une pensée spéciale pour mon vieux chum Doum. Repose en paix Chef ! Finalement, sachez que j'ai toujours aimé les négligés et détesté les favoris... Vive les rats, les marmottes et les mulots ;)

VI – Références

Adams, J. C., and Watt, F. M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117, 1183-1198.

Aldiri, I., and Vetter, M. L. (2009). Characterization of the expression pattern of the PRC2 core subunit Suz12 during embryonic development of *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 238, 3185-3192.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G. Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.

Auclair, B. A., Benoit, Y. D., Rivard, N., Mishina, Y., and Perreault, N. (2007). Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology* 133, 887-896.

Auclair, J. (2005). Etude des interactions cellule-matrice dans l'ancrage des cellules souches humaines. Memoire de maitrise, ProQuest, AAT MR17267.

Babeu, J. P., Darsigny, M., Lussier, C. R., and Boudreau, F. (2009). Hepatocyte nuclear factor 4{alpha} contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297, G124-134.

Babyatsky, M. W., and Podolsky, D. K. (1999). Growth and development of the gastrointestinal tract. In *Textbook of gastroenterology*, T. Yamada, editor, ed. (Philadelphia: J.B Lippincott), pp. 547-584.

Barker, N., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22, 1856-1864.

Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., and Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003-1007.

Barry, S. T., and Critchley, D. R. (1994). The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and

the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J Cell Sci* 107 (Pt 7), 2033-2045.

Basora, N., Vachon, P. H., Herring-Gillam, F. E., Perreault, N., and Beaulieu, J. F. (1997). Relation between integrin alpha7Bbeta1 expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology* 113, 1510-1521.

Beaulieu, J. F. (1997). Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* 31, 1-78.

Beaulieu, J. F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 4, D310-321.

Beaulieu, J. F., Jutras, S., Durand, J., Vachon, P. H., and Perreault, N. (1993). Relationship between tenascin and alpha-smooth muscle actin expression in the developing human small intestinal mucosa. *Anat Embryol (Berl)* 188, 149-158.

Beaulieu, J. F., Millane, G., and Calvert, R. (1992). Developmental expression of two antigens associated with mouse intestinal crypts. *Dev Dyn* 193, 325-331.

Benoit, Y. D., Larrivee, J. F., Groulx, J. F., Stankova, J., Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (2010a). Integrin alpha8beta1 confers anoikis susceptibility to human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun*.

Benoit, Y. D., Lussier, C., Ducharme, P. A., Sivret, S., Schnapp, L. M., Basora, N., and Beaulieu, J. F. (2009). Integrin alpha8beta1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biol Cell* 101, 695-708.

Benoit, Y. D., Pare, F., Francoeur, C., Jean, D., Tremblay, E., Boudreau, F., Escaffit, F., and Beaulieu, J. F. (2010b). Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, G504-517.

Benoit, Y. D., Teller, I. C., Herring, E., and Beaulieu, J. F. (2007). Characterization of the integrin alpha8 beta1 - nephronectin interaction in the human intestinal mucosa. *Gastroenterology* 132, A632.

Bershadsky, A., Kozlov, M., and Geiger, B. (2006). Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. *Curr Opin Cell Biol* 18, 472-481.

Beuling, E., Bosse, T., van de Kerk, D. J., Piaseckij, C. M., Fujiwara, Y., Katz, S. G., Orkin, S. H., Grand, R. J., and Krasinski, S. D. (2008). GATA4 mediates gene repression in the mature mouse small intestine through interactions with friend of GATA (FOG) cofactors. *Dev Biol* 322, 179-189.

Bieritz, B., Spessotto, P., Colombatti, A., Jahn, A., Prols, F., and Hartner, A. (2003). Role of alpha8 integrin in mesangial cell adhesion, migration, and proliferation. *Kidney Int* 64, 119-127.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (2005). Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G381-387.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (2006). Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Methods Enzymol* 419, 337-383.

Booth, C., and Potten, C. S. (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 105, 1493-1499.

Bosse, T., Fialkovich, J. J., Piaseckyj, C. M., Beuling, E., Broekman, H., Grand, R. J., Montgomery, R. K., and Krasinski, S. D. (2007). Gata4 and Hnf1alpha are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1302-1314.

Bosse, T., Piaseckyj, C. M., Burghard, E., Fialkovich, J. J., Rajagopal, S., Pu, W. T., and Krasinski, S. D. (2006a). Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine. *Mol Cell Biol* 26, 9060-9070.

Bosse, T., van Wering, H. M., Gielen, M., Dowling, L. N., Fialkovich, J. J., Piaseckyj, C. M., Gonzalez, F. J., Akiyama, T. E., Montgomery, R. K., Grand, R. J., and Krasinski, S. D. (2006b). Hepatocyte nuclear factor-1alpha is required for expression but dispensable for histone acetylation of the lactase-phlorizin hydrolase gene in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G1016-1024.

Bossy, B., Bossy-Wetzel, E., and Reichardt, L. F. (1991). Characterization of the integrin alpha 8 subunit: a new integrin beta 1-associated subunit, which is prominently expressed on axons and on cells in contact with basal laminae in chick embryos. *Embo J* 10, 2375-2385.

Bouchard, V., Demers, M. J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Fujita, N., Tsuruo, T., Beaulieu, J. F., Gauthier, R., Vezina, A., Villeneuve, L., and Vachon, P. H. (2007). Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol* 212, 717-728.

Bouchard, V., Harnois, C., Demers, M. J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Gauthier, R., Vezina, A., Noel, D., Fujita, N., Tsuruo, T., *et al.* (2008). B1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: integration of complex regulatory mechanisms. *Apoptosis* 13, 531-542.

Boudreau, F., Lussier, C. R., Mongrain, S., Darsigny, M., Drouin, J. L., Doyon, G., Suh, E. R., Beaulieu, J. F., Rivard, N., and Perreault, N. (2007). Loss of cathepsin L activity promotes claudin-1 overexpression and intestinal neoplasia. *Faseb J* 21, 3853-3865.

Boudreau, F., Rings, E. H., van Wering, H. M., Kim, R. K., Swain, G. P., Krasinski, S. D., Moffett, J., Grand, R. J., Suh, E. R., and Traber, P. G. (2002). Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* 277, 31909-31917.

Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., *et al.* (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.

Bracken, A. P., and Helin, K. (2009). Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 773-784.

Brandenberger, R., Schmidt, A., Linton, J., Wang, D., Backus, C., Denda, S., Muller, U., and Reichardt, L. F. (2001). Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin alpha8beta1 in the embryonic kidney. *J Cell Biol* 154, 447-458.

Cao, R., and Zhang, Y. (2004). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 15, 57-67.

Cerignoli, F., Rahmouni, S., Ronai, Z., and Mustelin, T. (2006). Regulation of MAP kinases by the VHR dual-specific phosphatase: implications for cell growth and differentiation. *Cell Cycle* 5, 2210-2215.

Cetin, S., Ford, H. R., Sysko, L. R., Agarwal, C., Wang, J., Neal, M. D., Baty, C., Apodaca, G., and Hackam, D. J. (2004). Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. *J Biol Chem* 279, 24592-24600.

Cetin, S., Leapheart, C. L., Li, J., Ischenko, I., Hayman, M., Upperman, J., Zamora, R., Watkins, S., Ford, H. R., Wang, J., and Hackam, D. J. (2007). Nitric oxide inhibits enterocyte migration through activation of RhoA-GTPase in a SHP-2-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1347-1358.

Chamberlain, S. J., Yee, D., and Magnuson, T. (2008). Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cells* 26, 1496-1505.

Cheng, C. W., Ka, S. M., Yang, S. M., Shui, H. A., Hung, Y. W., Ho, P. C., Su, Y. C., and Chen, A. (2008). Nephronectin expression in nephrotoxic acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transplant* 23, 101-109.

Cheng, H., and Leblond, C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 141, 537-561.

Citi, S., Paschoud, S., Pulimeno, P., Timolati, F., De Robertis, F., Jond, L., and Guillemot, L. (2009). The tight junction protein cingulin regulates gene expression and RhoA signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1165, 88-98.

Clark, E. A., and Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239.

Cotsarelis, G., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61, 1329-1337.

Croft, D. R., and Olson, M. F. (2006). The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 26, 4612-4627.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808.

Darzynkiewicz, Z., Li, X., and Bedner, E. (2001). Use of flow and laser-scanning cytometry in analysis of cell death. *Methods Cell Biol* 66, 69-109.

Denda, S., Muller, U., Crossin, K. L., Erickson, H. P., and Reichardt, L. F. (1998). Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin alpha 8 beta 1 receptor interactions with tenascin: murine alpha 8 beta 1 binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C. *Biochemistry* 37, 5464-5474.

Desloges, N., Basora, N., Perreault, N., Bouatrouss, Y., Sheppard, D., and Beaulieu, J. F. (1998). Regulated expression of the integrin alpha9beta1 in the epithelium of the developing human gut and in intestinal cell lines: relation with cell proliferation. *J Cell Biochem* 71, 536-545.

Divine, J. K., McCaul, S. P., and Simon, T. C. (2003). HNF-1alpha and endodermal transcription factors cooperatively activate Fabp1: MODY3 mutations abrogate cooperativity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G62-72.

Duprey, P., Chowdhury, K., Dressler, G. R., Balling, R., Simon, D., Guenet, J. L., and Gruss, P. (1988). A mouse gene homologous to the Drosophila gene caudal is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. *Genes Dev* 2, 1647-1654.

- Dusing, M. R., Brickner, A. G., Lowe, S. Y., Cohen, M. B., and Wiginton, D. A. (2000). A duodenum-specific enhancer regulates expression along three axes in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G1080-1093.
- Dusing, M. R., and Wiginton, D. A. (2005). Epithelial lineages of the small intestine have unique patterns of GATA expression. *J Mol Histol* 36, 15-24.
- Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Basora, N., Groulx, J. F., Auclair, J., Francoeur, C., Escaffit, F., Pare, F., Herring, E., Menard, D., and Beaulieu, J. F. (2009). Differential expression of the integrins alpha6Abeta4 and alpha6Bbeta4 along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Histochem Cell Biol* 131, 531-536.
- Eckhardt, B. L., Parker, B. S., van Laar, R. K., Restall, C. M., Natoli, A. L., Tavarra, M. D., Stanley, K. L., Sloan, E. K., Moseley, J. M., and Anderson, R. L. (2005). Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 3, 1-13.
- Erickson, R. H., Gum, J. R., Lotterman, C. D., Hicks, J. W., Lai, R. S., and Kim, Y. S. (1999). Regulation of the gene for human dipeptidyl peptidase IV by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *Biochem J* 338 (Pt 1), 91-97.
- Erickson, R. H., Lai, R. S., Lotterman, C. D., and Kim, Y. S. (2000). Identification of upstream stimulatory factor as an activator of the human dipeptidyl peptidase IV gene in Caco-2 cells. *Gene* 258, 77-84.
- Escaffit, F., Boudreau, F., and Beaulieu, J. F. (2005a). Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol* 203, 15-26.
- Escaffit, F., Pare, F., Gauthier, R., Rivard, N., Boudreau, F., and Beaulieu, J. F. (2006). Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 66-72.
- Escaffit, F., Perreault, N., Jean, D., Francoeur, C., Herring, E., Rancourt, C., Rivard, N., Vachon, P. H., Pare, F., Boucher, M. P., *et al.* (2005b). Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. *Exp Cell Res* 302, 206-220.
- Fang, R., Olds, L. C., and Sibley, E. (2006). Spatio-temporal patterns of intestine-specific transcription factor expression during postnatal mouse gut development. *Gene Expr Patterns* 6, 426-432.
- Farias, E., Lu, M., Li, X., and Schnapp, L. M. (2005). Integrin alpha8beta1-fibronectin interactions promote cell survival via PI3 kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 305-311.

Feher, J. J., Fullmer, C. S., and Wasserman, R. H. (1992). Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am J Physiol* 262, C517-526.

Gagne, D., Groulx, J. F., Benoit, Y. D., Basora, N., Herring, E., Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (2010). Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 222, 387-400.

Gao, N., White, P., and Kaestner, K. H. (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* 16, 588-599.

Gauthier, R., Harnois, C., Drolet, J. F., Reed, J. C., Vezina, A., and Vachon, P. H. (2001). Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1540-1554.

Geiger, B., and Bershadsky, A. (2001). Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 13, 584-592.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793-805.

Gendron, F. P., Mongrain, S., Laprise, P., McMahon, S., Dubois, C. M., Blais, M., Asselin, C., and Rivard, N. (2006). The CDX2 transcription factor regulates furin expression during intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G310-318.

Germain, M., Affar, E. B., D'Amours, D., Dixit, V. M., Salvesen, G. S., and Poirier, G. (1999). Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 274, 28379-28384.

Giancotti, F. G. (1997). Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9, 691-700.

Glinksy, G. V. (2008). "Stemness" genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management. *J Clin Oncol* 26, 2846-2853.

Gokhale, P. J., and Andrews, P. W. (2009). Human embryonic stem cells: 10 years on. *Lab Invest* 89, 259-262.

Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R., Huerta, M., and Lopez-Bayghen, E. (2009). The tight junction protein ZO-2 blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 expression. *Ann N Y Acad Sci* 1165, 121-125.

Gout, S. P., Jacquier-Sarlin, M. R., Rouard-Talbot, L., Rousselle, P., and Block, M. R. (2001). RhoA-dependent switch between $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. *Mol Biol Cell* 12, 3268-3281.

Gracz, A. D., Ramalingam, S., and Magness, S. T. (2010). Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, G590-600.

Grossmann, J., Mohr, S., Lapentina, E. G., Fiocchi, C., and Levine, A. D. (1998). Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 274, G1117-1124.

Gu, N., Adachi, T., Matsunaga, T., Tsujimoto, G., Ishihara, A., Yasuda, K., and Tsuda, K. (2007). HNF-1 α participates in glucose regulation of sucrase-isomaltase gene expression in epithelial intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 617-622.

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.

Haas, C. S., Amann, K., Schittny, J., Blaser, B., Muller, U., and Hartner, A. (2003). Glomerular and renal vascular structural changes in $\alpha 8$ integrin-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 14, 2288-2296.

Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33, 891-895.

Harnois, C., Demers, M. J., Bouchard, V., Vallee, K., Gagne, D., Fujita, N., Tsuruo, T., Vezina, A., Beaulieu, J. F., Cote, A., and Vachon, P. H. (2004). Human intestinal epithelial crypt cell survival and death: Complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J Cell Physiol* 198, 209-222.

He, X. C., Zhang, J., Tong, W. G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D. H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L. M., *et al.* (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36, 1117-1121.

Hinoi, T., Lucas, P. C., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K. R., and Fearon, E. R. (2002). CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia. *Gastroenterology* 123, 1565-1577.

Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136, 509-523.

Islam, S., Loizides, A. M., Fialkovich, J. J., Grand, R. J., and Montgomery, R. K. (2010). Developmental Expression of Eph and Ephrin Family Genes in Mammalian Small Intestine. *Dig Dis Sci*.

James, R., and Kazenwadel, J. (1991). Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *J Biol Chem* 266, 3246-3251.

Kahai, S., Lee, S. C., Seth, A., and Yang, B. B. (2010). Nephronectin promotes osteoblast differentiation via the epidermal growth factor-like repeats. *FEBS Lett* 584, 233-238.

Kashyap, V., Rezende, N. C., Scotland, K. B., Shaffer, S. M., Persson, J. L., Gudas, L. J., and Mongan, N. P. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev* 18, 1093-1108.

Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Lee, C. S., Labosky, P. A., Yang, V. W., and Kaestner, K. H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 129, 2619-2628.

Kirmizis, A., Bartley, S. M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P. J. (2004). Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev* 18, 1592-1605.

Krasinski, S. D., Van Wering, H. M., Tannemaat, M. R., and Grand, R. J. (2001). Differential activation of intestinal gene promoters: functional interactions between GATA-5 and HNF-1 alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G69-84.

Kung, J. W., and Forbes, S. J. (2009). Stem cells and liver repair. *Curr Opin Biotechnol* 20, 568-574.

Kuphal, S., Wallner, S., and Bosserhoff, A. K. (2008). Loss of nephronectin promotes tumor progression in malignant melanoma. *Cancer Sci* 99, 229-233.

Lai, J. M., Hsieh, C. L., and Chang, Z. F. (2003). Caspase activation during phorbol ester-induced apoptosis requires ROCK-dependent myosin-mediated contraction. *J Cell Sci* 116, 3491-3501.

Leblond, C. P., and Inoue, S. (1989). Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 185, 367-390.

Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K., *et al.* (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125, 301-313.

- Lemieux, E., Bergeron, S., Durand, V., Asselin, C., Saucier, C., and Rivard, N. (2009). Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int J Cancer* *125*, 1575-1586.
- Levine, D., Rockey, D. C., Milner, T. A., Breuss, J. M., Fallon, J. T., and Schnapp, L. M. (2000). Expression of the integrin $\alpha 8 \beta 1$ during pulmonary and hepatic fibrosis. *Am J Pathol* *156*, 1927-1935.
- Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* *327*, 542-545.
- Linton, J. M., Martin, G. R., and Reichardt, L. F. (2007). The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin $\alpha 8 \beta 1$ -mediated stimulation of Gdnf expression. *Development* *134*, 2501-2509.
- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I. D., Patel, S., Ahn, N. S., Jackson, K. W., Suri, P., and Wicha, M. S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* *66*, 6063-6071.
- Lock, J. G., Wehrle-Haller, B., and Stromblad, S. (2008). Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol* *18*, 65-76.
- Loirand, G., Guerin, P., and Pacaud, P. (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* *98*, 322-334.
- Lorentz, O., Duluc, I., Arcangelis, A. D., Simon-Assmann, P., Kedinger, M., and Freund, J. N. (1997). Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* *139*, 1553-1565.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* *193*, 265-275.
- Lu, M., Munger, J. S., Steadele, M., Busald, C., Tellier, M., and Schnapp, L. M. (2002). Integrin $\alpha 8 \beta 1$ mediates adhesion to LAP-TGF $\beta 1$. *J Cell Sci* *115*, 4641-4648.
- Lui, W. Y., Wong, E. W., Guan, Y., and Lee, W. M. (2007). Dual transcriptional control of claudin-11 via an overlapping GATA/NF-Y motif: positive regulation through the interaction of GATA, NF-YA, and CREB and negative regulation through the interaction of Smad, HDAC1, and mSin3A. *J Cell Physiol* *211*, 638-648.
- Lussier, C., Basora, N., Bouatrouss, Y., and Beaulieu, J. F. (2000). Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech* *51*, 169-178.

- Lussier, C. R., Babeu, J. P., Auclair, B. A., Perreault, N., and Boudreau, F. (2008). Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G418-428.
- Majewski, I. J., Blewitt, M. E., de Graaf, C. A., McManus, E. J., Bahlo, M., Hilton, A. A., Hyland, C. D., Smyth, G. K., Corbin, J. E., Metcalf, D., *et al.* (2008). Polycomb repressive complex 2 (PRC2) restricts hematopoietic stem cell activity. *PLoS Biol* 6, e93.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91-98.
- Mathews, L. A., Crea, F., and Farrar, W. L. (2009). Epigenetic gene regulation in stem cells and correlation to cancer. *Differentiation* 78, 1-17.
- Ménard, D., Beaulieu, J.-F., Boudreau, F., Perreault, N., Rivard, N., and Vachon, P.-H. (2006). Gastrointestinal tract. In *Cell Signaling and Growth Factors in Development: From molecules to Organogenesis*, Vol vol. 2, Weinheim: Wiley-Vch edn).
- Mercurio, A. M. (1995). Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol* 5, 419-423.
- Mitchelmore, C., Troelsen, J. T., Spodsberg, N., Sjostrom, H., and Noren, O. (2000). Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1alpha mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem J* 346 Pt 2, 529-535.
- Montgomery, R. K., and Breault, D. T. (2008). Small intestinal stem cell markers. *J Anat* 213, 52-58.
- Montgomery, R. K., and Shivdasani, R. A. (2009). Prominin1 (CD133) as an intestinal stem cell marker: promise and nuance. *Gastroenterology* 136, 2051-2054.
- Morales, F. C., Takahashi, Y., Kreimann, E. L., and Georgescu, M. M. (2004). Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17705-17710.
- Morin, A. (2009). Analyse des interactions entre les cellules epitheliales intestinales et le collagene. Memoire de maitrise, ProQuest, AAT MR61429.
- Muller, U., Bossy, B., Venstrom, K., and Reichardt, L. F. (1995). Integrin alpha 8 beta 1 promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin. *Mol Biol Cell* 6, 433-448.
- Murayama, M., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Akiyama, J., Nakamura, T., Sakamoto, N., Kanai, T., and Watanabe, M. (2009). Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell-specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 44, 173-182.

- Ng, R. K., and Gurdon, J. B. (2008). Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle* 7, 1173-1177.
- Ni, H., Dydensborg, A. B., Herring, F. E., Basora, N., Gagne, D., Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (2005). Upregulation of a functional form of the beta4 integrin subunit in colorectal cancers correlates with c-Myc expression. *Oncogene* 24, 6820-6829.
- Nightingale, K. P., O'Neill, L. P., and Turner, B. M. (2006). Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* 16, 125-136.
- Noble, J. E., and Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. *Methods Enzymol* 463, 73-95.
- Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nemoto, Y., Akiyama, J., Nakamura, T., Kanai, T., and Watanabe, M. (2009). Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G23-35.
- Pageot, L. P., Perreault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P., and Beaulieu, J. F. (2000). Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech* 49, 394-406.
- Perdiguero, E., Sousa-Victor, P., Ballestar, E., and Munoz-Canoves, P. (2009). Epigenetic regulation of myogenesis. *Epigenetics* 4, 541-550.
- Perreault, N., and Beaulieu, J. F. (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 224, 354-364.
- Perreault, N., and Beaulieu, J. F. (1998). Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 245, 34-42.
- Pizzatti, L., Binato, R., Cofre, J., Gomes, B. E., Dobbin, J., Haussmann, M. E., D'Azambuja, D., Bouzas, L. F., and Abdelhay, E. (2010). SUZ12 is a candidate target of the non-canonical WNT pathway in the progression of chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 107-118.
- Potten, C. S. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* 273, G253-257.
- Potten, C. S., Booth, C., and Pritchard, D. M. (1997). The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 78, 219-243.
- Potten, C. S., Booth, C., Tudor, G. L., Booth, D., Brady, G., Hurley, P., Ashton, G., Clarke, R., Sakakibara, S., and Okano, H. (2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 71, 28-41.

Quaroni, A., and Beaulieu, J. F. (1997). Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 113, 1198-1213.

Reddig, P. J., and Juliano, R. L. (2005). Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 24, 425-439.

Russell, R. G., Lasorella, A., Dettin, L. E., and Iavarone, A. (2004). Id2 drives differentiation and suppresses tumor formation in the intestinal epithelium. *Cancer Res* 64, 7220-7225.

Russo, J. M., Florian, P., Shen, L., Graham, W. V., Tretiakova, M. S., Gitter, A. H., Mrsny, R. J., and Turner, J. R. (2005). Distinct temporal-spatial roles for rho kinase and myosin light chain kinase in epithelial purse-string wound closure. *Gastroenterology* 128, 987-1001.

Sakaguchi, T., Gu, X., Golden, H. M., Suh, E., Rhoads, D. B., and Reinecker, H. C. (2002). Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J Biol Chem* 277, 21361-21370.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21, 1-26.

Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 15, 763-770.

Sangiorgi, E., and Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40, 915-920.

Sato, Y., Uemura, T., Morimitsu, K., Sato-Nishiuchi, R., Manabe, R., Takagi, J., Yamada, M., and Sekiguchi, K. (2009). Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin alpha8beta1. *J Biol Chem* 284, 14524-14536.

Schnapp, L. M., Breuss, J. M., Ramos, D. M., Sheppard, D., and Pytela, R. (1995a). Sequence and tissue distribution of the human integrin alpha 8 subunit: a beta 1-associated alpha subunit expressed in smooth muscle cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 2), 537-544.

Schnapp, L. M., Hatch, N., Ramos, D. M., Klimanskaya, I. V., Sheppard, D., and Pytela, R. (1995b). The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J Biol Chem* 270, 23196-23202.

Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C., and Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 134, 849-864.

Seltana, A., Basora, N., and Beaulieu, J. F. (2010). Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. *Wound Repair Regen* 18, 114-122.

Sheppard, D. (1996). Epithelial integrins. *Bioessays* 18, 655-660.

Smith, K. S., Chanda, S. K., Lingbeek, M., Ross, D. T., Botstein, D., van Lohuizen, M., and Cleary, M. L. (2003). Bmi-1 regulation of INK4A-ARF is a downstream requirement for transformation of hematopoietic progenitors by E2a-Pbx1. *Mol Cell* 12, 393-400.

Smith, L. L., Cheung, H. K., Ling, L. E., Chen, J., Sheppard, D., Pytela, R., and Giachelli, C. M. (1996). Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J Biol Chem* 271, 28485-28491.

Soshnikova, N., and Duboule, D. (2009). Epigenetic regulation of vertebrate Hox genes: a dynamic equilibrium. *Epigenetics* 4, 537-540.

Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 846-856.

Strumpf, D., Mao, C. A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132, 2093-2102.

Subauste, M. C., Pertz, O., Adamson, E. D., Turner, C. E., Junger, S., and Hahn, K. M. (2004). Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol* 165, 371-381.

Suh, E., and Traber, P. G. (1996). An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 16, 619-625.

Teller, I. C., Auclair, J., Herring, E., Gauthier, R., Menard, D., and Beaulieu, J. F. (2007). Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit. *Dev Dyn* 236, 1980-1990.

Tetreault, M. P., Chailier, P., Beaulieu, J. F., Rivard, N., and Menard, D. (2008). Epidermal growth factor receptor-dependent PI3K-activation promotes restitution of wounded human gastric epithelial monolayers. *J Cell Physiol* 214, 545-557.

Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.

Thomson, A. B., Drozdowski, L., Iordache, C., Thomson, B. K., Vermeire, S., Clandinin, M. T., and Wild, G. (2003a). Small bowel review: Normal physiology, part 1. *Dig Dis Sci* 48, 1546-1564.

Thomson, A. B., Drozdowski, L., Iordache, C., Thomson, B. K., Vermeire, S., Clandinin, M. T., and Wild, G. (2003b). Small bowel review: Normal physiology, part 2. *Dig Dis Sci* 48, 1565-1581.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Tremblay, E., Auclair, J., Delvin, E., Levy, E., Menard, D., Pshezhetsky, A. V., Rivard, N., Seidman, E. G., Sinnett, D., Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (2006). Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J Cell Biochem* 99, 1175-1186.

Troelsen, J. T. (2005). Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys Acta* 1723, 19-32.

Tsuchiya, K., Okamoto, R., Tetsuya, N., and Watanabe, M. (2009). GSK3 Inhibitor Induces the Intestinal Differentiation By the Protein Stabilization of Atoh1. *Gastroenterology* 136, A-392.

Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* 2, E231-236.

Uesaka, T., Kageyama, N., and Watanabe, H. (2004). Identifying target genes regulated downstream of Cdx2 by microarray analysis. *J Mol Biol* 337, 647-660.

Vachon, P. H., and Beaulieu, J. F. (1992). Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103, 414-423.

Vachon, P. H., Durand, J., and Beaulieu, J. F. (1993). Basement membrane formation and re-distribution of the beta 1 integrins in a human intestinal co-culture system. *Anat Rec* 235, 567-576.

Vachon, P. H., Harnois, C., Grenier, A., Dufour, G., Bouchard, V., Han, J., Landry, J., Beaulieu, J. F., Vezina, A., Dydensborg, A. B., *et al.* (2002). Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* 123, 1980-1991.

Vachon, P. H., Simoneau, A., Herring-Gillam, F. E., and Beaulieu, J. F. (1995). Cellular fibronectin expression is down-regulated at the mRNA level in differentiating human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 216, 30-34.

Vainionpää, N., Kikkawa, Y., Lounatmaa, K., Miner, J. H., Rousselle, P., and Virtanen, I. (2006). Laminin-10 and Lutheran blood group glycoproteins in adhesion of human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C764-775.

van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959-963.

van Wering, H. M., Bosse, T., Musters, A., de Jong, E., de Jong, N., Hogen Esch, C. E., Boudreau, F., Swain, G. P., Dowling, L. N., Montgomery, R. K., *et al.* (2004). Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G899-909.

Vidrich, A., Buzan, J. M., and Cohn, S. M. (2003). Intestinal stem cells and mucosal gut development. *Curr Opin Gastroenterol* 19, 583-590.

Wagner, T. E., Frevert, C. W., Herzog, E. L., and Schnapp, L. M. (2003). Expression of the integrin subunit alpha8 in murine lung development. *J Histochem Cytochem* 51, 1307-1315.

Walker, E., Chang, W. Y., Hunkapiller, J., Cagney, G., Garcha, K., Torchia, J., Krogan, N. J., Reiter, J. F., and Stanford, W. L. (2010). Polycomb-like 2 associates with PRC2 and regulates transcriptional networks during mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 6, 153-166.

Walker, J. L., and Assoian, R. K. (2005). Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer Metastasis Rev* 24, 383-393.

Walters, J. R. (2005). Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 21, 135-140.

Wang, Y., Guan, Y., Wang, F., Huang, A., Wang, S., and Zhang, Y. A. (2010). Bmi-1 regulates self-renewal, proliferation and senescence of human fetal neural stem cells in vitro. *Neurosci Lett*.

Westerman, B. A., Murre, C., and Oudejans, C. B. (2003). The cellular Pax-Hox-helix connection. *Biochim Biophys Acta* 1629, 1-7.

Yamagata, K., Nanno, T., Moriwaki, M., Ihara, A., Iizuka, K., Yang, Q., Satoh, T., Li, M., Uenaka, R., Okita, K., *et al.* (2002). Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes* 51, 114-123.

Yang, M. C., Chi, N. H., Chou, N. K., Huang, Y. Y., Chung, T. W., Chang, Y. L., Liu, H. C., Shieh, M. J., and Wang, S. S. (2010). The influence of rat mesenchymal stem cell CD44 surface markers on cell growth, fibronectin expression, and cardiomyogenic differentiation on silk fibroin - Hyaluronic acid cardiac patches. *Biomaterials* 31, 854-862.

Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R., and Bodmer, W. F. (2010). Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3722-3727.

Yokosaki, Y., Matsuura, N., Higashiyama, S., Murakami, I., Obara, M., Yamakido, M., Shigeto, N., Chen, J., and Sheppard, D. (1998). Identification of the ligand binding site for the integrin alpha9 beta1 in the third fibronectin type III repeat of tenascin-C. *J Biol Chem* 273, 11423-11428.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* 116, 4605-4613.

Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., and Geiger, B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* 32, 416-420.

Zargham, R., and Thibault, G. (2005). alpha8beta1 Integrin expression in the rat carotid artery: involvement in smooth muscle cell migration and neointima formation. *Cardiovasc Res* 65, 813-822.

Zargham, R., and Thibault, G. (2006). Alpha 8 integrin expression is required for maintenance of the smooth muscle cell differentiated phenotype. *Cardiovasc Res* 71, 170-178.

Zargham, R., Touyz, R. M., and Thibault, G. (2007a). alpha 8 Integrin overexpression in de-differentiated vascular smooth muscle cells attenuates migratory activity and restores the characteristics of the differentiated phenotype. *Atherosclerosis* 195, 303-312.

Zargham, R., Wamhoff, B. R., and Thibault, G. (2007b). RNA interference targeting alpha8 integrin attenuates smooth muscle cell growth. *FEBS Lett* 581, 939-943.

Zhang, J., Li, W., Sanders, M. A., Sumpio, B. E., Panja, A., and Basson, M. D. (2003). Regulation of the intestinal epithelial response to cyclic strain by extracellular matrix proteins. *Faseb J* 17, 926-928.

Ziegler, W. H., Liddington, R. C., and Critchley, D. R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* 16, 453-460.

Zimmerman, B., Volberg, T., and Geiger, B. (2004). Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 58, 143-159.